AURORA POPESCU
ELENA CRISTEA • MARCELA ZAMFIRESCU-GHEORGHIU

BIOCHIMIE MEDICALĂ

EDITURA MEDICALĂ

577.1 : 61

AURORA POPESCU
Profesor dr. doc.

ELENA CRISTEA
Conferențiar dr.

MARCELA ZAMFIRESCU-GHEORGHIU
Dr. doc. cercetător științific

BIOCHIMIE MEDICALĂ

EDITURA MEDICALĂ — BUCUREȘTI, 1980

Scanned with OKEN Scanner

PREFAȚĂ

În ansamblul științelor medicale, Biochimia se încadrează ca o știință care contribuie la progresul diverselor ramuri ale medicinii. Ea reprezintă disciplina de confluență a posibilităților de studiu și de înțelegere a fenomenului biologic uman, în care componentele moleculare integrate în structuri cu dublă accepție — biologică și chimică — îndeplinesc în mod superior organizat funcții cu aceeași semnificație dual. Lucrarea de față caută să releve aceste caractere adresîndu-se atît studenților în medicină și biologie, cercetătorilor în domeniul biologico-medical cît și medicilor interesați în cunoașterea bazelor moleculare ale problemelor de etiopatogenie, fiziopatologie, diagnostic, prognostic și orientare a terapiei.

Cea mai mare parte a conținutului acestei cărți este rezervată datelor fundamentale asupra structurii și organizării materiei vii precum și prezentării căilor metabolice de bază. Cunoașterea acestor date este indispensabilă înțelegerii problemelor biologico-medicale, dezvoltate în special, în capitolele privind biochimia țesuturilor și organelor. Metodologia aplicată în studiile și cercetările actuale de biochimie medicală precum și în practica de chimie clinică este prezentată numai la nivel principial.

În tratarea problemelor s-a avut în vedere nivelul de pregătire al cititorilor și s-a urmărit reactualizarea noțiunilor fundamentale pentru cei care au venit în contact cu ele într-un trecut mai mult sau mai puțin îndepărtat.

Lucrarea este concepută în ideea că învățămîntul de biochimie trebuie să dezvolte un mod de gîndire sistemic care să ajute la formarea cadrelor, în vederea asigurării unei legături — reciproc vitalizante — dintre această știință de bază și practica medicală. În acest scop prezentarea materialului este făcută integrativ, cu accentul pe biochimia macromoleculelor cu activitate biologică specifică, genetică moleculară, evoluție biochimică, interrelații metabolice, mecanisme de reglare, bioenergetică, mecanisme de biotransformare a substanțelor străine și medicamentelor etc. S-a căutat să se precizeze caracteristicile funcționale și metabolice ale țesuturilor și cooperarea dintre organe — pe cît a fost posibil, la nivelul cunoștințelor actuale — precum și corespondența dintre diferitele planuri de organizare morfofuncțional, molecular și uneori chiar electronic. În cadrul expunerii, pe lîngă structuri și mecanisme de reacție, s-au folosit scheme figurative care să înlesnească înțelegerea integrării fenomenelor prezentate.

Scanned with OKEN Scanner

În ansamblul lucrării s-a căutat să se aducă o informație cît mai completă la nivelul stadiului actual de dezvoltare a biochimiei medicale, ca ramură a celei generale, conturîndu-se totodată și aspectele deficitare, incerte sau contradictorii care pot constitui un stimulent pentru studii și cercetări viitoare.

Dată fiind amploarea și complexitatea materialului sînt posibile unele omisiuni care sperăm să nu afecteze fondul lucrării, al cărei scop este în esență didactic.

AUTORII

Scanned with OKEN Scanner

CUPRINSUL

CAPITOLUL I (Conf. dr. Elena Cristea)

INTRODUCERE

CAPITOLUL II (Prof. dr. doc. Aurora Popescu)

PROCESE HIDROELECTROLITICE DIN ORGANISM

1. Apa 19
   1.1. Repartiția apei în organism ... 20
   1.2. Rolurile apei în organism 21
   1.3. Unele proprietăți fizico-chimice ale apei 23
      1.3.1. Punctul de topire și punctul de fierbere 23
      1.3.2. Căldura specifică și căldura de vaporizare 24
      1.3.3. Polaritatea moleculei de apă 24
      1.3.4. Asocierea moleculară și legătura de hidrogen 25
      1.3.5. Structuri corespunzătoare unor stări de agregare ale apei 26
      1.3.6. Apa ca dizolvant 26
      1.3.7. Ionizarea apei și produsul ionic al apei 28
2. Reacția soluțiilor 29
   2.1. Simbolurile (H^+) și (HO^-) 29
   2.2. Simbolurile pH, pOH și pK ... 30
3. Acizii și bazele 32
   3.1. Reacții protolitice 33
   3.2. Amfoliții 34
   3.3. Tăria acizilor și bazelor 35
   3.4. Hidroliza sărurilor 37
   3.5. Procese biochimice fundamentale prin care se generează acizi și baze în organism 38
4. Sistemele tampon 40
   4.1. Mecanismul acțiunii sistemelor tampon 40
   4.2. Proprietățile sistemelor tampon 41
   4.3. Sistemele tampon din organism 44
   4.4. Utilizarea sistemelor tampon pentru determinarea pH-ului unei soluții 45
      4.4.1. Indicatorii de neutralizare 46
      4.4.2. Metoda colorimetrică 47

CAPITOLUL III (Prof. dr. doc. Aurora Popescu)

PROTEINELE

1. Aminoacizii 48
   1.1. Clasificarea α-aminoacizilor din constituția proteinelor 48
   1.2. Proprietățile fizice ale aminoacizilor 51
      1.2.1. Starea de agregare și stabilitatea 51
      1.2.2. Solubilitatea 51
      1.2.3. Activitatea optică 51
   1.3. Proprietățile electrochimice ale aminoacizilor 52
   1.4. Proprietățile chimice ale aminoacizilor 56
      1.4.1. Reacțiile grupării amino ... 56
      1.4.2. Reacțiile grupării carboxil 59
      1.4.3. Reacții la care participă simultan grupările $—NH_2$ și —COOH 59
   1.5. Alți aminoacizi de interes biochimic 60
   1.6. Identificarea și dozarea aminoacizilor 61
      1.6.1. Reacții de culoare 61
      1.6.2. Spectre de absorbție în ultraviolet 61
      1.6.3. Metode microbiologice 61
      1.6.4. Metoda diluției izotopice 62
      1.6.5. Metode cromatografice 62
      1.6.6. Metoda electroforetică 67
2. Peptidele 67
   2.1. Clasificare 68
   2.2. Nomenclatură 68
   2.3. Izomerie 68
   2.4. Proprietățile electrochimice ale peptidelor 69
   2.5. Determinarea constituției peptidelor 69
   2.6. Peptide naturale importante ... 70
3. Proteinele 71
   3.1. Compoziția elementară a proteinelor 72
   3.2. Proprietățile fizice ale proteinelor 72
      3.2.1. Starea de agregare și stabilitatea 72
      3.2.2. Solubilitatea 72
      3.2.3. Precipitarea 72

Scanned with OKEN Scanner

3.3. Electrochimia proteinelor 73
3.3.1. Punctul izoelectric şi punctul izoionic 74
3.3.2. Acţiunea tampon a proteinelor 75
3.3.3. Importanţa fiziologică a tamponării exercitată în organism de către proteine 75
3.3.4. Polaritatea moleculelor proteice 75
3.4. Greutăţile moleculelor proteice şi determinarea lor 76
3.4.1. Principiul metodei ultracentrifugării analitice 76
3.5. Structura proteinelor 78
3.5.1. Structura primară 79
3.5.2. Structura secundară 80
3.5.3. Structura terţiară 81
3.5.4. Structura cuaternară 82
3.6. Denaturarea proteinelor 84
3.6.1. Agenţii denaturanţi 84
3.6.2. Cele două tipuri de denaturări 84
3.7. Proprietăţile antigenice ale proteinelor 85
3.8. Clasificarea proteinelor 86
3.8.1. Proteinele simple 86
3.8.2. Proteinele conjugate 88
3.9. Fracţionarea, analiza şi criteriile de puritate ale proteinelor 91
3.9.1. Metode curente de fracţionare a proteinelor 92
3.9.2. Analiza şi criteriile de puritate 92

CAPITOLUL IV (Prof. dr. doc. Aurora Popescu)

ENZIMELE

1. Introducere 96
2. Însuşirile catalitice ale enzimelor ... 97
3. Natura şi structura enzimelor 100
3.1. Enzime de natură exclusiv proteică 100
3.1.1. Situsul activ 100
3.1.2. Evidenţierea situsului activ 102
3.2. Enzime de natură heteroproteică 103
3.2.1. Diverse categorii de coenzime 103
4. Cinetica enzimatică 107
4.1. Mecanismul acţiunii enzimatice 107
4.2. Exprimarea activităţii enzimatice 108
4.3. Determinarea vitezei unei reacţii enzimatice 109
4.4. Relaţia dintre viteza unei reacţii enzimatice şi cantitatea de enzimă care o catalizează 109
4.5. Relaţia dintre viteza unei reacţii enzimatice şi concentraţia substratului asupra căruia acţionează enzima 109
4.5.1. Teoria Michaelis-Menten ... 110
4.5.2. Ecuaţia Michaelis 112
4.5.3. Valoarea constantei Michaelis 112
4.5.4. Ecuaţia Lineweaver-Burk .. 113
5. Influenţa factorilor de mediu asupra activităţii enzimatice 115
5.1. Influenţa temperaturii 115
5.2. Influenţa pH-ului 116
5.3. Influenţa ionilor 117
5.4. Influenţa potenţialului redox 118
5.5. Influenţa presiunii şi a radiaţiilor 118
6. Efectorii enzimatici 118
6.1. Activatorii 118
6.1.1. Activarea prin ioni 119
6.1.2. Activarea prin transformarea unei proenzime în enzimă 119
6.1.3. Activarea prin antiinhibiţie 120
6.1.4. Activarea prin protejarea enzimei 120
6.2. Inhibitorii 121
6.2.1. Inhibiţia competitivă 121
6.2.2. Inhibiţia necompetitivă ... 123
6.2.3. Inhibiţia prin substrat 124
6.2.4. Inhibiţia prin produşii de reacţie 125
7. Efectorii alosterici 125
7.1. Inhibitorii alosterici 125
7.2. Activatorii alosterici 126
7.3. Cinetica enzimelor alosterice ... 127
8. Repartizarea celulară a enzimelor 130
9. Relaţia dintre enzime şi patologie 131
10. Izoenzimele 132
10.1. Definiţii 132
10.2. Exemple de izoenzime 132
10.3. Criteriile de diferenţiere şi de nomenclatură ale izoenzimelor 133
11. Enzime imobilizate 134
12. Clasificarea enzimelor 135
12.1. Introducere 135
12.2. Clasificarea fundamentală a enzimelor şi criteriile de nomenclatură 136
12.2.1. Oxidoreductazele 136
12.2.2. Transferazele 139
12.2.3. Hidrolazele 143
12.2.4. Liazele 146
12.2.5. Izomerazele 147
12.2.6. Ligazele 148

CAPITOLUL V (Prof. dr. doc. Aurora Popescu)

ACIZII NUCLEICI

1. Constituţia acizilor nucleici 150
1.1. Bazele pirimidinice 150
1.2. Bazele purinice 151
2. Nomenclatura nucleotidelor şi a nucleozidelor 151
2.1. Numele nucleotidelor 151
2.2. Numele nucleozidelor 153

Scanned with OKEN Scanner

3. Structura acizilor nucleici 153
4. Greutăţile moleculare, localizarea, speciile şi rolurile acizilor nucleici 155
4.1. Specii mai importante de acizi nucleici 156
4.1.1. Acizii dezoxiribonucleici..... 156
4.1.2. Acizii ribonucleici solubili sau de transport 156
4.1.3. Acizii ribonucleici ribozomali 157
4.1.4. Acizii ribonucleici mesageri 157
5. Sinteza acizilor nucleici 157
5.1. Biosinteza ADN-ului 157
5.2. Biosinteza ARN-ului 158
5.2.1. Sistemul polinucleotidfosforilazei 158
5.2.2. Sistemul ARN-polimerazei 159

CAPITOLUL VI (Prof. dr. doc. Aurora Popescu)

BIOSINTEZA PROTEINELOR

1. Necesitatea sintezei proteinelor în organism 160
2. Unităţi funcţionale care participă la biosinteza proteinelor 160
2.1. m-ARN 160
2.2. Ribozomii 161
2.3. t-ARN..... 161
2.4. Codul genetic 162
2.5. Aminoacizii 163
3. Mecanismul biosintezei proteinelor 164
3.1. Reacţia de iniţiere 164
3.2. Formarea lanţului polipeptidic 164
3.3. Reacţia de oprire 166
4. Reglarea biosintezei proteinelor ... 167
4.1. Inducţia 167
4.1.1. Inducţia enzimatică 167
4.2. Represia 168
4.2.1. Represia enzimatică 168
4.3. Teoria operonului 169
4.3.1. Reglarea biosintezei proteinelor la procariote 169
4.3.2. Reglarea biosintezei proteinelor la eucariote 171
4.4. Reglarea hormonală 171

CAPITOLUL VII (Prof. dr. doc. Aurora Popescu)

NOŢIUNI DE GENETICĂ MOLECULARĂ

1. Introducere 172
2. Mutaţii 172
2.1. Natura mutaţiilor 172
2.2. Mutaţiile chimice 173
2.2.1. Mutaţii provocate de acidul azotos 173
2.2.2. Mutaţii provocate de 5-bromo-uracil 173
2.3. Mutaţiile punctiforme 173
2.3.1. Mutaţii prin substituţie ... 173
2.3.2. Mutaţii prin inversare 174
2.3.3. Mutaţii prin suprimare ... 174
2.3.4. Mutaţii prin inserţie 174
2.4. Consecinţele mutaţiilor la nivelul genei structurale 174
2.4.1. Mutaţie benignă 174
2.4.2. Mutaţie neutră 175
2.4.3. Mutaţie nocivă 175
2.5. Evoluţia proteinelor..... 176
3. Mecanismul acţiunii antibioticelor 178
3.1. Antibiotice care se opun diviziunii ADN-ului 178
3.2. Antibiotice care inhibă transcripţia..... 179
3.3. Antibiotice care inhibă traducerea codului genetic 179
3.4. Antibiotice care intervin în citirea codului genetic 179
3.5. Antibiotice care acţionează asupra peretelui celular al bacteriilor 180
4. Biosinteza de peptide fără participarea ribozomilor 180
5. Particularităţile cromozomilor la eucariote 182
6. Interferonul..... 183
6.1. Definiţie 183
6.2. Proprietăţile interferonului ... 184
6.3. Inductorii 184
6.4. Reglarea genetică a formării interferonului 185
6.5. Mecanismul de acţiune al interferonului 186
6.6. Posibilităţi şi perspective de utilizare a interferonului 186

CAPITOLUL VIII (Conf. dr. Elena Cristea)

MOBILIZAREA ŞI TRANSFERUL DE ENERGIE ÎN ORGANISMELE VII

1. Noţiuni de bioenergetică..... 188
1.1. Energia liberă 190
1.2. Energia liberă de reacţie..... 193
1.3. Potenţialele redox şi modificările de energie liberă 195
2. Cuplarea energetică a reacţiilor endergonice şi exergonice 197
2.1. Legături macroergice şi compuşi macroergici..... 198
2.2. Rolul ATP-ului în transferul de energie 202
2.2.1. Utilizarea metabolică a ATP-ului 203
2.2.2. Sinteza energetică a ATP-ului 204
2.2.3. Generalităţi cu privire la desfăşurarea reacţiilor de oxidare biologică 205
3. Fosforilări oxidative cuplate cu oxidarea unor metaboliţi 206
3.1. Sinteza de ATP cuplată cu oxidarea gliceraldehidei-3-fosfat ... 207

Scanned with OKEN Scanner

3.2. Sinteza de ATP cuplată cu transformarea acidului 2-fosfogliceric în acid piruvic 209
3.3. Sinteza de ATP cuplată cu decarboxilarea oxidativă a acidului α-cetoglutaric 210
4. Lanțul respirator și fosforilarea oxidativă 210
4.1. Lanțul respirator 210
4.2. Fosforilarea oxidativă cuplată cu lanțul respirator 216
4.2.1. Mecanismul fosforilării oxidative 218
4.2.2. Controlul respirator 220
4.2.3. Decuplarea respirației de fosforilare 222
5. Oxidazele cu funcție mixtă 223

CAPITOLUL IX (Conf. dr. Elena Cristea)

METABOLISMUL GLUCIDELOR

1. Chimia glucidelor 225
1.1. Monozaharidele 225
1.1.1. Stereoizomeria monozaharidelor 225
1.1.2. Structurile ciclice ale monozaharidelor 228
1.1.3. Proprietățile monozaharidelor 231
1.2. Oligozaharidele 235
1.3. Polizaharidele (glicanii) 237
2. Digestia și absorbția glucidelor 239
3. Degradarea oxidativă a glucozei ... 240
3.1. Glicoliza (calea Embden-Meyerhof) 241
3.1.1. Bilanțul energetic al glicolizei 245
3.1.2. Importanța metabolică a glicolizei 245
3.2. Degradarea oxidativă completă (arderea) a glucozei pînă la bioxid de carbon și apă 247
3.2.1. Secvența Embden-Meyerhof 248
3.2.2. Decarboxilarea oxidativă a acidului piruvic 248
3.2.3. Ciclul acizilor tricarboxilici 249
3.2.4. Oxidarea hidrogenului în lanțul respirator 254
3.2.5. Bilanțul energetic global al degradării oxidative a glucozei 255
3.3. Calea fosfogluconatului (calea pentozo-fosfaților) 256
4. Metabolismul glicogenului 260
4.1. Glicogenoliza 260
4.2. Glicogenogeneza 264
4.3. Tulburări ereditare ale metabolismului glicogenului (glicogenoze) 268
5. Gluconeogeneza 269
5.1. Calea gluconeogenetică 271
5.2. Reglarea gluconeogenezei 274
6. Reglarea glicemiei 276
6.1. Căile de intrare a glucozei în sînge 277
6.2. Căile de ieșire a glucozei din sînge 277
7. Metabolismul fructozei 279
8. Metabolismul galactozei 280
9. Metabolismul acidului glucuronic ... 282
10. Mucopolizaharidele (glicozaminoglicanii) 284

CAPITOUL X (Conf. dr. Elena Cristea)

METABOLISMUL LIPIDELOR

1. Chimia lipidelor 291
1.1. Acizii grași 292
1.2. Gliceridele (acilgliceroli sau grăsimi neutre) 293
1.3. Glicerofosfolipidele (fosfatide) 295
1.3.1. Fosfatidil-colinele (lecitine) 295
1.3.2. Fosfatidil-etanolaminele (cefaline) 296
1.3.3. Fosfatidil-serinele (serin-cefaline) 297
1.3.4. Fosfatidil-inozitolii (inozitol-fosfatide, fosfoinozitide) 297
1.3.5. Plasmalogenele (acetal-fosfatide) 298
1.3.6. Fosfatidil-glicerolii 298
1.4. Sfingolipidele 299
1.4.1. Sfingomielinele 299
1.4.2. Cerebrozidele 299
1.4.3. Gangliozidele 300
1.5. Compușii steroidici 301
1.5.1. Sterolii 302
1.5.2. Acizii biliari 305
1.6. Carotenoizii 306
2. Digestia și absorbția lipidelor 308
3. Transformările metabolice ale lipidelor 310
3.1. Metabolismul acizilor grași 310
3.1.1. Catabolismul acizilor grași 310
3.1.2. Biosinteza acizilor grași ... 314
3.2. Metabolismul glicerolului 318
3.3. Metabolismul trigliceridelor ... 319
3.3.1. Hidroliza trigliceridelor 319
3.3.2. Biosinteza trigliceridelor ... 320
3.4. Metabolismul fosfatidelor 321
3.4.1. Degradarea fosfatidelor ... 321
3.4.2. Sinteza *de novo* a fosfatidelor 322
4. Lipidele plasmatice 324
4.1. Analiza lipidelor plasmatice ... 324
4.2. Sursele și căile de utilizare a lipidelor sanguine 327
4.2.1. Chilomicronii 327
4.2.2. Lipoproteinele cu densitate foarte mică 329
4.2.3. Lipoproteinele cu densitate mică 329

Scanned with OKEN Scanner

4.2.4. Lipoproteinele cu densitate mare 330
4.2.5. Acizii graşi liberi 330
5. Rolurile ţesutului adipos şi ale ficatului în mobilizarea, transportul şi utilizarea lipidelor 330
5.1. Ţesutul adipos 331
5.1.1. Lipogeneza 331
5.1.2. Lipoliza 333
5.2. Ficatul 334
6. Metabolismul colesterolului 336
6.1. Digestia, absorbţia şi transportul colesterolului 337
6.2. Colesterolul plasmatic 338
6.3. Biosinteza colesterolului 340
6.4. Catabolismul colesterolului 344
7. Dislipidemiile 346
7.1. Hipolipoproteinemiile 347
7.2. Hiperlipoproteinemiile 347
7.2.1. Hiperlipoproteinemia de tip I 347
7.2.2. Hiperlipoproteinemia de tip II 348
7.2.3. Hiperlipoproteinemia de tip III 348
7.2.4. Hiperlipoproteinemia de tip IV 348
7.2.5. Hiperlipoproteinemia de tip V 348
8. Lipidozele (tulburări ale metabolismului celular al lipidelor) 349

CAPITOLUL XI (Conf. dr. Elena Cristea)

METABOLISMUL PROTEINELOR ŞI AL AMINOACIZILOR

1. Introducere 351
2. Digestia proteinelor 354
3. Absorbţia aminoacizilor 357
4. Metabolismul general al aminoacizilor 357
4.1. Degradarea oxidativă a aminoacizilor 358
4.2. Gluconeogeneza din aminoacizi 360
4.3. Decarboxilarea 360
4.4. Biosinteza aminoacizilor neesenţiali 361
5. Metabolismul amoniacului 363
6. Metabolismul individual al aminoacizilor 367
6.1. Alanina 368
6.2. Glicocolul (glicina) 368
6.3. Serina 370
6.4. Acidul glutamic 371
6.5. Glutamina 371
6.6. Acidul aspartic 372
6.7. Asparagina 372
6.8. Prolina 373
6.9. Metionina 373
6.10. Cisteina 374
6.11. Treonina 375
6.12. Arginina 376
6.13. Lizina 377
6.14. Leucina, valina şi izoleucina 377
6.15. Tirozina 378
6.16. Fenilalanina 379
6.17. Histidina 381
6.18. Triptofanul 382
7. Interrelaţii între metabolismul glucidelor, lipidelor şi al proteinelor ... 383

CAPITOLUL XII (Conf. dr. Elena Cristea)

METABOLISMUL NUCLEOTIDELOR PURINICE ŞI PIRIMIDINICE

1. Metabolismul nucleotidelor purinice 389
1.1. Sinteza *de novo* a nucleotidelor purinice 389
1.2. Sinteza de nucleozid-difosfaţi şi nucleozid-trifosfaţi 391
1.3. Reglarea biosintezei nucleotidelor purinice 392
1.4. Reutilizarea bazelor purinice 392
1.5. Sinteza dezoxiribonucleotidelor 393
1.6. Catabolismul nucleotidelor purinice 394
1.7. Guta 395
2. Metabolismul nucleotidelor pirimidinice 397
2.1. Sinteza nucleotidelor pirimidinice 397
2.2. Catabolismul nucleotidelor pirimidinice 399

CAPITOLUL XIII (Conf. dr. Elena Cristea)

HORMONII

1. Introducere 401
2. Hormonii tiroidieni 407
3. Parathormonul şi calcitonina 410
3.1. Parathormonul 410
3.2. Calcitonina 412
4. Hormonii pancreatici 413
4.1. Insulina 413
4.2. Glucagonul 416
5. Hormonii medulosuprarenalieni 447
6. Hormonii corticosuprarenalieni 420
7. Hormonii sexuali 426
7.1. Androgenii 427
7.2. Estrogenii 428
7.3. Progestinele 430
8. Hormonii neurohipofizari 431
9. Hormonii adenohipofizari şi hipotalamici 432
9.1. Hormonul de creştere 435
9.2. Corticotropina 436
9.3. Tireotropina 437
9.4. Gonadotropinele 437

Scanned with OKEN Scanner

9.5. Prolactina 438
9.6. Melanotropina 438
10. Epifiza 439
11. Hormonii tractului gastrointestinal 440
11.1. Gastrina 440
11.2. Secretina 440
11.3. Pancreozimina (colecistokinina) 440

CAPITOLUL XIV (Dr. doc. Marcela Zamfirescu-Gheorghiu)

BIOCHIMIA SÎNGELUI

1. Funcţiile sîngelui 441
1.1. Funcţii de transport 442
1.2. Funcţia reglatoare homeostatică 442
2. Volumul sanguin 443
2.1. Valori relative ale volumelor eritroplasmatice 443
2.2. Volumul sanguin total 443
3. Elementele figurate ale sîngelui 444
3.1. Eritrocitele 444
3.1.1. Bazele moleculare ale maturării seriei roşii 445
3.1.2. Compoziţia chimică a eritrocitelor 445
3.1.3. Compartimentele funcţionale ale eritrocitului 447
3.1.4. Metabolismul eritrocitului matur 448
3.1.5. Mecanismul de reglare a glicolizei anaerobe 452
3.1.6. Calea şuntului pentozic ... 453
3.1.7. Utilizarea oxigenului în eritrocit 453
3.1.8. Menţinerea glutationului ... 454
3.1.9. Enzimopatii congenitale ... 455
3.1.10. Funcţiile endergonice eritrocitare 456
3.1.11. Hemoglobina 458
3.2. Leucocitele 472
3.2.1. Granulocitele 472
3.2.2. Monocitul 479
3.3. Trombocitele 479
3.3.1. Funcţiile trombocitului ... 480
3.3.2. Bazele structurale ale funcţiilor trombocitare 480
3.3.3. Bazele moleculare ale funcţiilor trombocitare 481
3.3.4. Analogia metabolică dintre trombocit şi muşchiul scheletic de „salt“ 482
3.3.5. Patologia biochimică a trombocitului 482
4. Hemostaza şi fibrinoliza 483
4.1. Coagularea (fazele şi factorii principalii ai coagulării) 483
4.1.1. Inhibitori ai coagulării 489
4.2. Fibrinoliza 490
5. Proteinele plasmatice 491
5.1. Funcţiile proteinelor plasmatice 491
5.2. Metode de dozare, separare şi caracterizare ale proteinelor plasmatice 492
5.2.1. Metode de dozare 492
5.2.2. Metode de separare şi caracterizare 493
5.3. Principalele proteine plasmatice 497
5.3.1. Albumina 497
5.3.2. Glicoproteinele plasmatice 503
5.4. Lipidele şi lipoproteinele plasmatice 506
5.4.1. Componentele lipidice 507
5.4.2. Separarea lipoproteinelor ... 510
5.5. Enzimele plasmatice 511
5.5.1. Clasificarea funcţională a enzimelor plasmatice 512
5.5.2. Mecanismul disenzimiei plasmatice 512
5.5.3. Principalele enzime plasmatice a căror determinare prezintă valoare diagnostică 514
6. Constituenţi minerali ai plasmei ... 521
6.1. Gazele din sînge 521
6.2. Electroliţi 523
6.2.1. Ionograma plasmatică normală 523
6.2.2. Presiunea osmotică a plasmei sanguine 523
6.2.3. Cationii 524
6.2.4. Anionii 525
6.2.5. Oligoelemente 526
7. Componente organice cu greutate moleculară mică 527
7.1. Substanţe azotate neproteice ... 527
7.1.1. Azotul neproteic 527
7.1.2. Ureea 528
7.1.3. Creatina 528
7.1.4. Creatinina 528
7.1.5. Acidul uric 529
7.1.6. Amoniacul şi aminoacizii ... 529
7.1.7. Polipeptide 531
7.1.8. Bilirubina 531
7.2. Substanţe organice neazotate 531
7.2.1. Glucoza 531
7.2.2. Compuşii lipidici 532
7.2.3. Acizii organici 532
7.2.4. Corpii cetonici 534

CAPITOLUL XV (Prof. dr. doc. Aurora Popescu)

BIOCHIMIA ŢESUTULUI CONJUNCTIV ŞI OSOS

1. Ţesutul conjunctiv 535
1.1. Structura ţesutului conjunctiv 535
1.1.1. Substanţa fundamentală ... 535
1.1.2. Celulele 536
1.1.3. Fibrele elastice 536
1.2. Constituenţii chimici ai ţesutului conjunctiv 536

Scanned with OKEN Scanner

1.2.1. Proteinele 536
1.2.2. Glucidele 543
1.2.3. Modificările constituenților țesutului conjunctiv 548
2. Țesutul osos 550
2.1. Compoziția țesutului osos 550
2.1.1. Constituenții minerali 551
2.1.2. Constituenții organici 552
2.2. Celulele osoase 552
2.3. Biochimia procesului de formare și dislocare a osului 553
2.3.1. Formarea osului 553
2.3.2. Dislocarea osului 553
2.3.3. Reglarea hormonală a formării și dislocării osului ... 554

CAPITOLUL XVI (Dr. doc. Marcela Zamfirescu-Gheorghiu)

BIOCHIMIA ȚESUTULUI HEPATIC

1. Structura morfofuncțională a ficatului 556
1.1. Unitatea morfofuncțională a ficatului 556
1.1.1. Lobulul hepatic 557
1.1.2. Acinul hepatic 557
1.2. Hepatocitul: caractere structurale și metabolice 557
1.3. Profilul enzimatic hepatic 558
1.3.1. Hepatocitul 558
1.3.2. Unitatea morfofuncțională a ficatului 560
1.3.3. Profilul enzimatic al organului întreg 562
2. Funcțiile ficatului și bazele lor moleculare 562
2.1. Participarea ficatului la procesele metabolice 563
2.1.1. Rolul ficatului în metabolismul glucidic 563
2.1.2. Rolul ficatului în metabolismul lipidic 564
2.1.3. Rolul ficatului în metabolismul proteic 566
2.1.4. Rolul ficatului în metabolismul porfirinelor 567
2.2. Secreția bilei 570
2.3. Funcția de detoxifiere 572
2.3.1. Faza I. Activitatea sistemului monooxidazic microzomal 573
2.3.2. Faza a II-a: mecanismul general al conjugării 579
2.3.3. Inducția enzimatică microzomală 584
2.4. Patologia biochimică a ficatului 584
2.5. Explorări funcționale hepatice sistematizate 586

CAPITOLUL XVII (Dr. doc. Marcela Zamfirescu-Gheorghiu)

BIOCHIMIA ȚESUTULUI MUSCULAR

1. Clasificarea mușchilor. Tipuri morfo-funcționale 589
1.1. Mușchii striați sau scheletici 589
1.2. Mușchii netezi 589
1.3. Mușchiul cardiac 589
2. Organizarea ultrastructurală a mușchiului scheletic 589
2.1. Fibra musculară 589
2.2. Sistemul de membrane interne 590
2.3. Ultrastructura miofibrilei 591
3. Compoziția chimică a mușchiului 592
3.1. Constituenți minerali 593
3.2. Constituenți organici 593
3.2.1. Substanțe cu greutate moleculară mică (extractibile) 593
3.2.2. Substanțe cu greutate moleculară mare neazotate 594
3.2.3. Proteinele 594
4. Contracția musculară 601
4.1. Metabolismul muscular 601
4.1.1. Metabolismul energetic, glicogenoliza 601
4.1.2. Metabolismul acizilor grași 602
4.1.3. Metabolismul compușilor macroergici: ATP și creatinfosfat (fosfagenul) 603
4.2. Teoriile contracției musculare 603
4.2.1. Teoria modificărilor conformaționale 603
4.2.2. Teoria alunecării (Hanson-Huxley) 605
5. Patologia biochimică a mușchiului 608
5.1. Patologia înnăscută 608
5.2. Patologia dobîndită 609

CAPITOLUL XVIII (Dr. doc. Marcela Zamfirescu-Gheorghiu)

BIOCHIMIA SISTEMULUI NERVOS

1. Elemente structurale ale țesutului nervos 611
1.1. Neuronii 611
1.2. Sinapsele 612
1.3. Celulele gliale 612
2. Compoziția țesutului nervos 613
2.1. Electroliții 613
2.2. Lipidele 614
2.3. Proteinele 615
2.4. Alți compuși azotați 616
2.4.1. Aminoacizii 616
2.4.2. Acizii nucleici și substanțele înrudite 616
2.4.3. Nucleoproteinele 617
2.5. Glucidele 617
2.6. Enzimele 617

Scanned with OKEN Scanner

2.7. Vitaminele 618
2.8. Mediatorii chimici 618
2.8.1. Acetilcolina 619
2.8.2. L-noradrenalina 619
2.8.3. Dopamina 619
2.8.4. Serotonina 619
2.8.5. GABA şi alţi aminoacizi 620
3. Elemente de farmacologie biochimică a mediatorilor chimici 620
4. Metabolismul sistemului nervos 621
4.1. Sinteza şi degradarea acetilcolinei 622
4.2. Şuntul GABA 622
4.3. Metabolismul acidului glutamic şi al glutaminei 623
5. Transmisia impulsului nervos 624
5.1. Excitabilitate. Potenţial de membrană 624
5.2. Potenţialul şi curentul de acţiune 625
5.3. Cauzele modificării permeabilităţii membranei 626
6. Patologia biochimică a sistemului nervos 628
6.1. Patologia biochimică înnăscută 628
6.2. Patologia biochimică dobîndită 628
6.2.1. Demielinizarea 628
6.2.2. Degenerescenţa Wallerianã 628
6.2.3. Polinevritele 629
6.2.4. Biochimia stărilor amnezice 629
6.2.5. Biochimia stărilor comatoase 629
7. Lichidul cefalo-rahidian 631

CAPITOLUL XIX (Dr. doc. Marcela Zamfirescu-Gheorghiu)

RINICHIUL ŞI URINA

1. Elemente de structură funcţională renală 634
1.1. Glomerulul 634
1.2. Tubul urinifer 636
1.2.1. Tubul contort proximal ... 636
1.2.2. Ansa Henle 637
1.2.3. Tubul contort distal şi tubul colector 637
2. Metabolismul ţesutului renal 637
2.1. Metabolismul energetic 637
2.2. Metabolismul azotat 638
3. Profilul enzimatic renal 639
4. Funcţiile renale şi mecanismul formării urinei 640
4.1. Filtrarea glomerulară 641
4.2. Resorbţia tubulară 642
4.3. Secreţia tubulară 643
5. Excreţia urinară a componentelor sanguine 644
5.1. Componente minerale 644
5.1.1. Apa 644
5.1.2. Excreţia ionilor de sodiu şi de clor 644
5.1.3. Excreţia potasiului 645
5.1.4. Excreţia ionului de calciu 645
5.1.5. Excreţia bicarbonaţilor şi a ionilor fosfat şi sulfat 645
5.1.6. Excreţia amoniacului urinar 646
5.1.7. Excreţia ionilor de hidrogen 646
5.1.8. Reglarea echilibrului acido-bazic în tubul contort distal 646
5.2. Componente organice 647
5.2.1. Glucoza 647
5.2.2. Corpii cetonici 648
5.2.3. Aminoacizii 648
5.2.4. Ureea 648
5.2.5. Creatinina 648
5.2.6. Acidul uric 649
5.2.7. Proteinele 649
5.2.8. Substanţe străine 649
6. Diluarea şi concentrarea urinei ... 649
7. Noţiunea de *„clearance“* (epurare) renal 650
8. Urina. Caractere generale: fizice şi chimice 652
8.1. Cantitatea 652
8.2. Aspectul şi mirosul 653
8.3. Culoarea 653
8.4. Densitatea şi vîscozitatea urinei normale 654
8.5. Reacţia urinei normale 654
9. Compoziţia chimică a urinei normale 655
9.1. Componente minerale 656
9.1.1. Clorul 656
9.1.2. Fosforul 656
9.1.3. Sulful 656
9.1.4. Cationii Na^+, K^+, Ca^{2+}, Mg^{2+} 656
9.1.5. Sărurile amoniacale 657
9.2. Componente organice 657
9.2.1. Ureea 657
9.2.2. Creatinina 657
9.2.3. Creatina urinară 657
9.2.4. Acidul uric 657
9.2.5. Aminoacizii 658
9.2.6. Acizii organici 660
10. Hormoni, vitamine, enzime 661
11. Componente anormale ale urinei ... 662
11.1. Glucidele. Diagnosticul unei meliturii 662
11.2. Proteinele 664
11.2.1. Proteinuria de tip tubular 664
11.2.2. Proteinuriile selective şi neselective 664
11.2.3. Paraproteinurie 664
11.3. Enzimele 666
11.4. Elemente biliare (pigmenţi şi acizi biliari) 666
11.4.1. Bilirubina directă 666
11.4.2. Urobilinogenul şi urobilina 667
11.4.3. Acizii biliari 667
11.5. Pigmenţii sanguini 667
11.6. Porfirinele 668
11.7. Corpii cetonici 669
11.8. Acidul fenilpiruvic 669
11.9. Alcaptonuria 669

Scanned with OKEN Scanner

11.10. Melaninele 669
12. Sedimentul urinar 669
12.1. Elemente organizate 670
12.2. Elemente neorganizate 670
12.3. Sedimentul urinar cantitativ 670
13. Litiaza renală 672
14. Rolul vasopresor al rinichiului 673
15. Explorarea funcțională renală 675
15.1. Probe funcționale globale 675
15.2. Probe funcționale selective ... 675
15.3. Explorarea funcțională a rinichiului, separat 675

CAPITOLUL XX (Prof. dr. doc. Aurora Popescu)

VITAMINELE

1. Introducere 676
1.1. Noțiunile de vitamină și de avitaminoză 676
1.2. Clasificarea vitaminelor 677
2. Vitaminele liposolubile 677
2.1. Vitamina A 677
2.1.1. Efectele carenței 677
2.1.2. Structura chimică 678
2.1.3. Modul de acțiune 678
2.1.4. Răspîndire 679
2.1.5. Nevoi 680
2.2. Vitamina D 680
2.2.1. Efectele carenței 680
2.2.2. Trecerea ergosterolului în ergocalciferol 680
2.2.3. Structuri chimice și proprietăți 682
2.2.4. Modul de acțiune 683
2.2.5. Răspîndire 684
2.2.6. Nevoi 684
2.3. Vitamina E 684
2.3.1. Efectele carenței 684
2.3.2. Structura chimică și proprietăți 685
2.3.3. Modul de acțiune 686
2.3.4. Răspîndire 688
2.3.5. Nevoia de vitamina E 688
2.4. Vitamina K 688
2.4.1. Efectele carenței 688
2.4.2. Structura chimică și proprietăți 689
2.4.3. Modul de acțiune 690
2.4.4. Antivitamina K-dicumarolul 690
3. Vitaminele hidrosolubile 691
3.1. Vitamina B_1 691
3.1.1. Efectele carenței 691
3.1.2. Constituția chimică și proprietăți 691
3.1.3. Rol metabolic 692
3.1.4. Răspîndire 693
3.1.5. Nevoi 693
3.2. Vitamina B_2 693
3.2.1. Efectele carenței 693
3.2.2. Structura chimică și proprietăți 693
3.2.3. Rol metabolic 694
3.2.4. Răspîndire 694
3.2.5. Nevoi 694
3.3. Vitamina PP 694
3.3.1. Efectele carenței 694
3.3.2. Structura chimică și proprietăți 694
3.3.3. Rol metabolic 695
3.3.4. Răspîndire 695
3.3.5. Nevoi 695
3.3.6. Formele de eliminare 695
3.3.7. Antivitamine PP 695
3.4. Vitamina B_6 696
3.4.1. Efectele carenței 696
3.4.2. Structura chimică și proprietăți 696
3.4.3. Rol metabolic 697
3.4.4. Răspîndire 698
3.4.5. Nevoi 698
3.5. Vitaminele din bios 698
3.5.1. Mezoinozitolul 698
3.5.2. Biotina 699
3.5.3. Acidul pantotenic 700
3.6. Acizii folici 700
3.7. Vitamina B_{12} 703
3.8. Vitamina C 706
3.8.1. Efectele carenței 706
3.8.2. Structura chimică și proprietăți 706
3.8.3. Biosinteza acidului ascorbic 707
3.8.4. Rol metabolic 708
3.8.5. Răspîndire 709
3.8.6. Nevoi 709

CAPITOLUL XXI (Dr. doc. Marcela Zamfirescu-Gheorghiu)

BIOCHIMIA RĂSPUNSULUI IMUN

1. Generalități 710
2. Modalități reacționale ale organismului 711
2.1. Rezistența generală nespecifică 711
2.2. Imunitatea specifică dobîndită 711
2.2.1. Posibilitățile de reacție specifică și nespecifică 712
2.3. Sistemul imun 712
2.3.1. Limfocite „T" și „B" 713
2.3.2. Etape celulare ale răspunsului imun 714
3. Antigenele 715
3.1. Determinanți antigenici 715
3.2. Antigenele complete 715
3.2.1. Condiții de antigenitate ... 716
3.2.2. Condiții de specificitate ... 717
3.2.3. Valența antigenelor 719
4. Haptene (antigene incomplete sau parțiale) 719
5. Tipuri de antigene cu importanță biologico-medicală 720
5.1. Virusurile cu structură macromoleculară nucleoproteică 720
5.2. Antigenele bacteriene 720

Scanned with OKEN Scanner

5.3. Bacilii Koch 722
5.4. Toxinele bacteriene 722
5.5. Antigene celulare şi tisulare ... 723
5.5.1. Antigenele heterofile sau antigenele Forssman 723
5.5.2. Antigenele specifice de grup sanguin 723
5.5.3. Antigenele leucocitare şi trombocitare 726
6. Anticorpii sau imunoglobulinele ... 726
6.1. Consideraţii generale..... 726
6.1.1. Model general de structură 727
6.2. Heterogenitatea imunoglobulinelor 728
6.3. Proprietăţi fizico-chimice şi biologice 728
6.3.1. Cîteva aspecte de compoziţie chimică şi structură ... 729
6.3.2. Clase şi structuri particulare ale imunoglobulinelor 731
7. Situsul de combinare a anticorpilor. Reacţia antigen-anticorp 735
8. Imunoglobulinele legate (sesile) de membranele celulare 735
8.1. Receptorii de suprafaţă ai celulelor imunocompetente 735
8.2. Beta$_2$-microglobuline şi antigenele HL-A 736
9. Biosinteza anticorpilor..... 738
9.1. Controlul genetic al sintezei Ig 738
9.2. Teoriile formării anticorpilor ... 739
10. Factori şi mecanisme de rezistenţă nespecifică 739
10.1. Sistemul complement..... 739
10.1.1. Nomenclatura ţi biochimia complementului 739
10.1.2. Unităţi funcţionale ale complementului..... 741
10.1.3. Mecanismul de activare a complementului..... 742
10.1.4. Patologia complementului 743
10.2. Properdina 743
10.3. Interferonul 743
10.4. Lizozimul 744
10.5. Reacţii de hipersensibilitate... 745
11. Patologica biochimică a sistemului imun 745
Bibliografie 748
Indice alfabetic 751

Scanned with OKEN Scanner

Capitolul I

INTRODUCERE

Cu toată varietatea și complexitatea chimică a organismelor, materia vie este organizată după un principiu unitar.

Componenții celulari nu alcătuiesc o serie continuă, mărimea și complexitatea biomoleculelor nu variază treptat. Un număr relativ redus de biomolecule au dimensiuni mici, ele cuprind cîteva zeci sau sute de atomi. Majoritatea constituenților celulari sînt însă macromolecule cu greutăți de ordinul sutelor de mii și al milioanelor. Speciile moleculare cu dimensiuni intermediare sînt practic absente. Această discontinuitate între mărimea și gradul de complexitate a celor două tipuri de biomolecule este rezultatul mijloacelor pe care celulele le utilizează pentru edificarea lor. Într-o primă etapă utilizînd elementele procurate de substanțele nutritive, organismele vii sintetizează biomoleculele primordiale: cîteva tipuri de monozaharide, douăzeci de aminoacizi, opt nucleotide, cîțiva acizi grași și alcooli. În această etapă a chimiei celulare se utilizează o mare diversitate de reacții ca prin legarea atom cu atom să se sintetizeze biomoleculele primordiale. Alături de termenii finali se formează numeroși compuși cu o existență efemeră, care, de cele mai multe ori, nu îndeplinesc nici o funcție specială.

O a doua etapă a chimiei celulare constă în policondensarea moleculelor primordiale în macromolecule: proteine, acizi nucleici, polizaharide, lipide complexe. Acest gen de sinteză are loc cu maximum de economie de materiale și energie. Prin repetarea aceluiași gen de reacție, moleculele mici dau naștere la macromolecule, fără formare de produși intermediari. Randamentul material este maxim și dispozitivul operațional foarte simplu, prin repetarea aceluiași proces dimensiunile moleculelor cresc treptat pînă la valori foarte mari. Această modalitate este cea mai economică și singura posibilă. Într-adevăr, construirea unei macromelecule cuprinzînd sute de mii de atomi pornindu-se de la atomi individuali ar prezenta dificultăți enorme din punct de vedere cinetic, material și energetic.

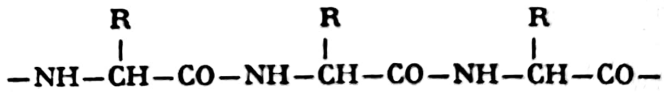
Componenții celulari, în afară de dimensiuni, se mai deosebesc și prin caracterul lor specific sau nespecific. Unii dintre ei sînt identici la toate formele vii, pe cînd alții prezintă specificitate de specie, de organ și mai ales de individ. Moleculele mici, biomoleculele primordiale — monozaharidele, aminoacizii, nucleotidele, acizii grași — sînt aceleași la toate organismele vii. La acest nivel varietatea chimică a celulelor rezultă numai din prezența sau absența unor tipuri de molecule. Constituenții celulari specifici sînt

Scanned with OKEN Scanner

macromoleculele proteice şi acizii nucleici. Aceste molecule pot exista într-o varietate practic infinită, dar fiecare celulă, fiecare organism cuprinde un set distinct de proteine şi acizi nucleici. Se estimează că în organismul uman ar exista 5 milioane specii de proteine şi un număr corespunzător de specii de acizi nucleici. Această diversitate moleculară se realizează prin mijloace foarte simple, prin combinarea unui număr redus de specii moleculare, douăzeci de aminoacizi pentru proteine şi cîte patru tipuri de nucleotide pentru acizii nucleici. Prin legarea unui număr mare al acestor unităţi în succesiuni variate se obţin nesfîrşit de multe combinaţii. O anume secvenţă de aminoacizi sau de nucleotide conţine o cantitate de informaţie care conferă proteinelor şi acizilor nucleici caracterul de molecule informaţionale. În contrast cu multiplicitatea posibilităţilor de legare a aminoacizilor în lanţuri polipeptidice sau a nucleotidelor în acizi nucleici, într-un organism dat nu se realizează decît succesiuni care îi sînt proprii, pentru care primeşte informaţie de la predecesori. Acizii dezoxiribonucleici sînt deţinătorii patrimoniului ereditar, ei cuprind instrucţiunile care specifică succesiunea de legare a aminoacizilor în moleculele proteice specifice, care devin astfel forma de exprimare a mesajului genetic.

Alte macromolecule, ca polizaharidele, sînt mai sărace în informaţie, ele sînt constituite dintr-una sau cîteva unităţi moleculare care se repetă monoton în lanţuri lineare sau ramificate. Diversitatea moleculară a acestor macromolecule este foarte redusă în comparaţie cu cea a macromoleculelor informaţionale.

Un alt atribut al organismelor vii, poate cel mai impresionant, este varietatea şi specificitatea formelor şi permanenţa lor peste generaţii. Specificitatea formelor se manifestă atît la nivelul organismului întreg, cît şi la toate nivelurile sale structurale, organe, celule, organite subcelulare. Substratul biochimic al structurilor morfologice este alcătuit din proteine, ori acestea — care, după apă, sînt cei mai abundenţi constituenţi celulari — prezintă o varietate moleculară infinită. Ele sînt alcătuite din lanţuri lineare polipeptidice:



Varietatea lanţurilor este conferită de distribuţia radicalilor, aparţinînd celor 20 de aminoacizi. La majoritatea proteinelor lanţurile polipeptidice se pliază, se îndoaie dînd forme compacte globulare. Numai puţine tipuri de proteine cuprind lanţuri întinse, au structuri fibroase. Varietatea morfologică a celulelor este asigurată de proteinele globulare. Forma unei molecule proteice este strict specifică secvenţei aminoacidice. Un lanţ polipeptidic cu o anume succesiune a resturilor de aminoacizi, din multitudinea de aranjamente spaţiale posibile adoptă unul singur şi totdeauna acelaşi. Acest aranjament spaţial este impus de constrîngeri fizico-chimice pentru a-i asigura maximum de stabilitate.

Arhitectura unei proteine globulare rezultă prin interacţiuni necovalente, punţi de hidrogen, atracţii polare, forţe van der Waals. Edificiile realizate prin astfel de forţe sînt stabile numai dacă implică un număr mare de astfel de legături şi numai dacă atomii se află „în contact" unii cu alţii. Plierea unui lanţ polipeptidic se face astfel încît să pună în contact cel mai mare număr posibil de atomi pentru succesiunea dată de aminoacizi. Prin urmare, din

Scanned with OKEN Scanner

motive de stabilitate, o proteină dată adoptă o arhitectură proprie. Mesajul genetic prescrie deci nu numai succesiunea aminoacizilor în lanţurile polipeptidice, dar şi aranjarea tridimensională a atomilor, forma moleculelor. Prin intervenţia acelorași forţe fizico-chimice, macromoleculele proteice formează asociaţii supramoleculare. Două molecule sau două regiuni ale acestor molecule pot realiza o asociaţie necovalentă dacă suprafeţe relativ întinse ale acestor regiuni sînt complementare, permit unui număr cît mai mare de atomi să vină în contact unii cu alţii. În structurarea unei proteine avem imaginea submicroscopică a morfogenezei structurilor celulare, a organismului însuşi. Prin proprietăţile lor asociative stereospecifice proteinele au capacitatea „să pipăie", să recunoască şi să aleagă alte molecule după formă, realizînd agregate specifice, atît în ceea ce priveşte compoziţia calitativă, cît şi cea cantitativă. Posibilitatea agregării moleculelor proteice este deci intrinsecă, morfogeneza formelor vii fiind spontană şi autonomă.

Structurile celulare sînt edificii complexe, cu entropii reduse, care se dezagregă şi se refac continuu. La organismul adult cele două procese sînt echilibrate, astfel încît masa sa rămîne constantă. Refacerea structurilor celulare are loc, în parte, pe seama produşilor de degradare a componenţilor proprii iar ceea ce se pierde ca deşeuri, este completat prin elementele luate din mediul înconjurător, ca substanţe nutritive.

Întreţinerea morfologiei proprii, creşterea şi dezvoltarea organismului implică şi un consum permanent de energie. În ultimă instanţă sursa primordială care alimentează cu energie întreaga biosferă este soarele. Plantele şi cîteva specii de microorganisme înmagazinează prin fotosinteză energia solară în zaharuri, grăsimi, proteine, care alcătuiesc hrana oamenilor sau a altor animale, consumate la rîndul lor de către om. Substanţele nutritive alcătuite din molecule organice complexe furnizează organismului energia chimică necesară pentru îndeplinirea tuturor funcţiilor inerente vieţii. De fapt, organismele animale iau din mediul înconjurător o formă de energie de calitate superioară pe care o utilizează pentru îndeplinirea funcţiilor vitale şi eliberează în mediu o cantitate de energie de calitate inferioară, de căldură.

Schimburile de materiale şi de energie dintre organism şi mediu, care definesc însăşi viaţa, implică desfăşurarea unui număr mare de reacţii chimice. Totalitatea reacţiilor chimice ce se petrec în organism alcătuiesc metabolismul, cu două laturi principale:

— degradarea constituenţilor celulari la compuşi mai simpli, catabolism;
— edificarea şi refacerea constituenţilor celulari, anabolism.

Catabolismul cuprinde reacţii de degradare, în care se mobilizează energie chimică pentru îndeplinirea funcţiilor vitale sau pentru edificarea de molecule necesare creşterii şi reparaţiilor tisulare. Reacţiile anabolice, biosintetice, consumă din energia mobilizată în procesele catabolice.

La baza activităţii chimice celulare stau enzimele care catalizează multitudinea de reacţii ce alcătuiesc metabolismul. Enzimele sînt proteine ce se caracterizează printr-o activitate catalitică mult superioară catalizatorilor neproteici şi o înaltă specificitate. Specificitatea enzimelor, atît în ce priveşte tipul de reacţie, cît şi natura moleculelor asupra cărora acţionează, este conferită de calităţile discriminatorii, s-ar putea spune cognitive, ale proteinelor. Prin proprietăţile asociative stereospecifice caracteristice proteinelor, enzimele acţionează numai asupra acelor molecule care se potrivesc stereospecific cu regiunea implicată în procesul catalitic. După formarea complexului stereo-

Scanned with OKEN Scanner

specific dintre enzimă şi substrat intervin forţele inductoare şi polarizante ale unor grupări din proteina enzimatică care determină reacţia chimică.

Reacţiile enzimatice care alcătuiesc metabolismul intermediar nu sînt independente ci alcătuiesc secvenţe liniare sau ramificate ori cicluri. În raport cu rolul lor biosintetic sau de degradare, secvenţele majore ale metabolismului sînt fie anabolice, fie catabolice. Cu toate că termenii extremi ai acestor secvenţe sînt aceiaşi, căile pe care se efectuează ele sînt diferite. De exemplu, glucoza şi acidul lactic sînt termenii extremi ai procesului catabolic denumit glicoliză şi ai căii anabolice de gluconeogeneză. La fel, acidul palmitic (sau alt acid gras) şi acidul acetic se află la capetele a două secvenţe, una catabolică şi alta anabolică. Cu toată identitatea termenilor extremi, procesele de biosinteză nu au loc prin inversarea reacţiilor prin care aceeaşi moleculă este degradată. Secvenţa anabolică nu este o simplă parcurgere în sens invers a celei catabolice. Chiar dacă anabolismul utilizează unele reacţii din secvenţele catabolice, cele două procese se diferenţiază prin una sau mai multe etape. Reacţiile distincte ale celor două secvenţe opuse sînt adesea acele reacţii care au efectele energetice cele mai pronunţate, adică sînt puternic endergonice sau exergonice.

Secvenţele anabolice şi cele catabolice sînt separate spaţial, au loc în compartimente subcelulare distincte: nucleu, mitocondrii, lisosomi, reticul endoplasmatic, membrana plasmatică sau citosol. De pildă, degradarea oxidativă a acizilor graşi are loc în mitocondrii, pe cînd sinteza lor se efectuează în citosol. Segregarea secvenţelor de sinteză şi de degradare a unui compus creează posibilitatea parcurgerii simultane a unor procese opuse şi reglarea lor independentă.

Un alt aspect important al metabolismului este coerenţa funcţională a diverselor reacţii chimice. Metabolismul nu este o sumă de reacţii, ci este alcătuit din sisteme de reacţii corelate unele cu altele care asigură funcţionarea optimă a organismului. Cu toate că organismul este sediul unei activităţi chimice atît de intense şi de variate, compoziţia sa chimică calitativă şi cantitativă este relativ constantă. Homeostazia biologică — menţinerea între anumite limite a parametrilor biochimici şi fiziologici ai organismului — apare paradoxală faţă de complexitatea sa metabolică. Această stabilitate aparentă şi armonizare a organismului cu mediul ambiant este rezultatul funcţionării unor mecanisme de autoreglare. La nivel celular se exercită un control primitiv metabolic prin accelerarea şi încetinirea reacţiilor metabolice ca rezultat al modificării activităţii enzimelor preexistente în celule sau prin inducţia şi represia sintezei proteinelor catalitice. La nivelul organismului întreg se adaugă sistemul de control neuro-umoral cu rol integrativ de coordonare a activităţilor metabolice celulare.

Scanned with OKEN Scanner

Capitolul II

PROCESE HIDROELECTROLITICE DIN ORGANISM

1. APA

Apa este principalul constituent al tuturor organismelor vii. Deşi se află totdeauna în proporţii apreciabile în aceste organisme (peste 60%), gradul de hidratare a lor variază cu natura speciei. De exemplu, organismele unor animale marine inferioare sînt aproape tot atît de bogate în apă ca şi mediul în care trăiesc (96,45%).

Conţinutul în apă al vertebratelor este mai redus din cauza scheletului care ocupă o mare parte din corp şi este sărac în apă. În ceea ce priveşte organismul omului, acesta cuprinde — în funcţie de adipozitate — între 58 şi 66% apă. La un om adult cu adipozitate normală (22%), organismul cuprinde apă în proporţie de cca 60% din greutate*. Bineînţeles, cu cît cantitatea de grăsime este mai redusă, proporţia de apă este mai mare şi invers (fig. II.1).

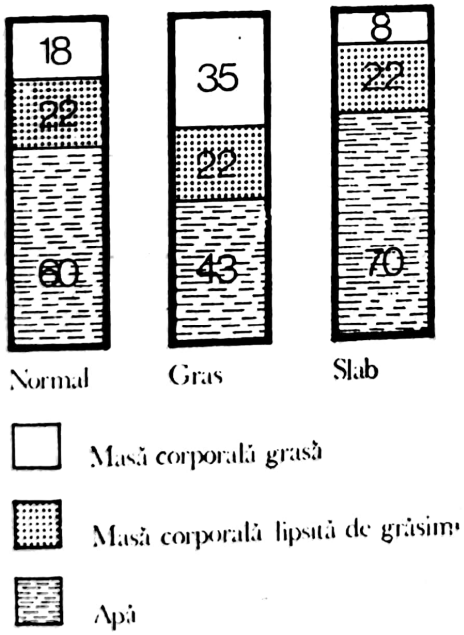


Fig. II.1. Conţinutul procentual în apă a diferitelor tipuri constituţionale.

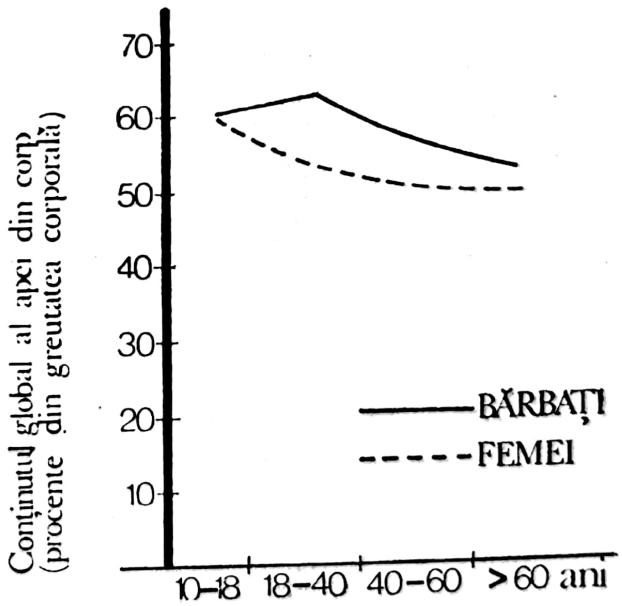


Fig. II.2. Conţinutul în apă al corpului în funcţie de vîrstă şi sex.

* Se poate afirma, cu oarecare aproximaţie, că organismul unui om adult de 65 kg are următoarea compoziţie globală: apă 42,9 kg, proteine 9,3 kg, lipide 8,35 kg, glucide 1,2 kg şi săruri minerale (cenuşă) 3,25 kg.

Scanned with OKEN Scanner

O mare influenţă asupra conţinutului în apă al organismului exercită şi vîrsta. Astfel, un embrion de cîteva zile conţine 97% apă; fătul de 3 luni conţine 94% iar organismul copilului la naştere conţine 66% apă. Ulterior, apa din organism continuă să scadă încet cu vîrsta, menţinîndu-se între limitele specificate anterior. De asemenea, conţinutul în apă al organismului variază şi cu sexul (fig. II.2).

Apa totală din corpul omului este repartizată în proporţii foarte variate în diverse organe sau lichide (tabelul II.1).

Tabelul II.1

Conţinutul în apă al unor organe, ţesuturi şi lichide din organismul omului

Organul, ţesutul sau lichidul	% din greutatea organului, ţesutului sau lichidului	% din apa totală a organismului	Organul, ţesutul sau lichidul	% din greutatea organului, ţesutului sau lichidului	% din apa totală a organismului
Saliva	99,5		Plămînii	78—79	
Sudoarea	99,5		Pancreasul	78	0,6
Lichidul cefalorahidian	99		Intestinul	77	3
Corpul vitros	98	0,1	Muşchii	73—76	50
Sucul gastric	97		Pielea	72	7—11
Limfa	96		Ficatul	70	3—5
Laptele	89		Grăsimile	30	12
Sîngele	78—83	10—12	Scheletul	20—30	10
Rinichiul	77—84		Dentina	10	0,5
Inima	79	2—5	Smalţul	2	0,1

În general, lichidele din organism — în afară de sînge — cuprind între 96 şi 99% apă, ţesuturile cca 80% (cu limitele 70—83%) şi scheletul 22%. Deşi conţinutul în apă al muşchilor nu depăşeşte pe cel al celorlalte ţesuturi moi sau pe cel al sîngelui, totuşi — din cauza masei musculare mari — apa cuprinsă în muşchi reprezintă jumătate din conţinutul global al apei din organism.

1.1. REPARTIŢIA APEI ÎN ORGANISM

Organismul uman cuprinde — aşa cum s-a arătat — 60% apă care se repartizează între vasele sanguine şi limfatice, spaţiile intercelulare şi celulele înseşi. Aceste domenii în care se repartizează apa din organism se deosebesc prin localizarea lor, prin compoziţie şi roluri funcţionale. Datorită acestor criterii de diferenţiere, ele sînt grupate în două sectoare hidrice: *sectorul intracelular* care reprezintă aproape 50% din greutatea corpului şi *sectorul extracelular* care reprezintă aproape 20% din greutatea corpului (fig. II.3).

Cele două sectoare hidrice (intra- şi extracelulare) sînt separate prin membrana celulară, a cărei permeabilitate *selectivă* determină deplasările apei şi electroliţilor. De fapt, această membrană este impermeabilă pentru Na^+ şi anionii mari şi este permeabilă pentru K^+ şi anionii mici. Ca urmare, există o diferenţă remarcabilă între compoziţia lichidelor extra- şi intracelulare (schema din fig. II.4).

Scanned with OKEN Scanner

Din schema figurii II.4 reiese că — în esență — lichidul extracelular este „o soluție de clorură de sodiu" pe cînd lichidul intracelular este „o soluție de fosfați și proteinat de potasiu". Într-adevăr, lichidul intracelular cuprinde o cantitate foarte mică de Cl^- și practic de loc Na^+ în schimb, conține o cantitate foarte mare de K^+ și de ioni fosforici precum și o proporție foarte mare de proteine.

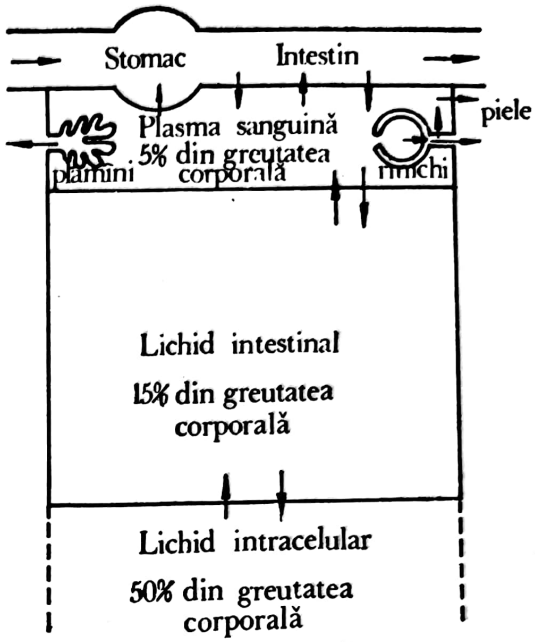


Fig. II.3. Repartiția apei în organism (după Gamble).

Sectorul extracelular este constituit, la rîndul său, din două compartimente: *lichidul interstițial* care ocupă spațiile intercelulare, reprezentînd cca 15% din greutatea corpului și *plasma sanguină* care reprezintă 5% din greutatea corpului. Aceste două compartimente sînt separate prin pereții vaselor capilare, permeabili pentru electroliți și molecule organice mici dar nu totdeauna permeabili pentru proteine. Datorită acestei permeabilități selective a pereților vaselor sanguine apar diferențe în compoziția compartimentelor extracelulare. Astfel, plasma cuprinde concentrații mari de ioni Na^+ și Cl^-, concentrații mici de ioni K^+ și fosforici precum și concentrații apreciabile de proteine. Lichidul interstițial cuprinde mult mai puține proteine însă compoziția sa în anioni și cationi este asemănătoare cu cea a plasmei.

Trebuie menționat aici faptul că din sectorul extracelular, alături de lichidul interstițial și plasma sanguină, se mai consideră că fac parte: limfa (interstițială și din vasele limfatice), fluidele din țesuturile conjunctive și din cartilaje, fluidele din oase și fluidele transcelulare. Acestea din urmă sînt reprezentate, în special, de: fluidul din tubul digestiv, cel din vezica urinară, fluidul din vezica biliară și lichidul cefalo-rahidian. Fluidele transcelulare se deosebesc de categoriile precedente deoarece împlinesc roluri funcționale particulare în organism și nu sînt în aceleași relații cu lichidul intracelular cum sînt limfa și plasma sanguină.

1.2. ROLURILE APEI ÎN ORGANISM

Apa îndeplinește în organism roluri multiple și variate. În primul rînd, ea are un rol structural, intrînd în constituția diverselor geluri. Acestea pot fi concepute ca rețele ale unor constituenți organici în ochiurile cărora circulă sau stagnează apa, fiind reținută prin capilaritate. Pe de altă parte, apa se află în spațiile libere dintre moleculele mari (în genere, proteice). În sfîrșit, o altă parte din apa structurală este unită cu înseși moleculele proteice (sau alte macromolecule) fiind reținută fizic la suprafața lor. Aceasta este apa legată, comparabilă — întrutotul — cu apa de hidratare a ionilor. (Vezi mai departe la proprietățile apei).

Scanned with OKEN Scanner

În al doilea rînd, apa este mediul „interior" în care se distribuie toate substanţele solubile. Cu alte cuvinte, ea îndeplineşte rolul de solvent natural al unui număr foarte mare de compuşi anorganici şi organici. Datorită acestei

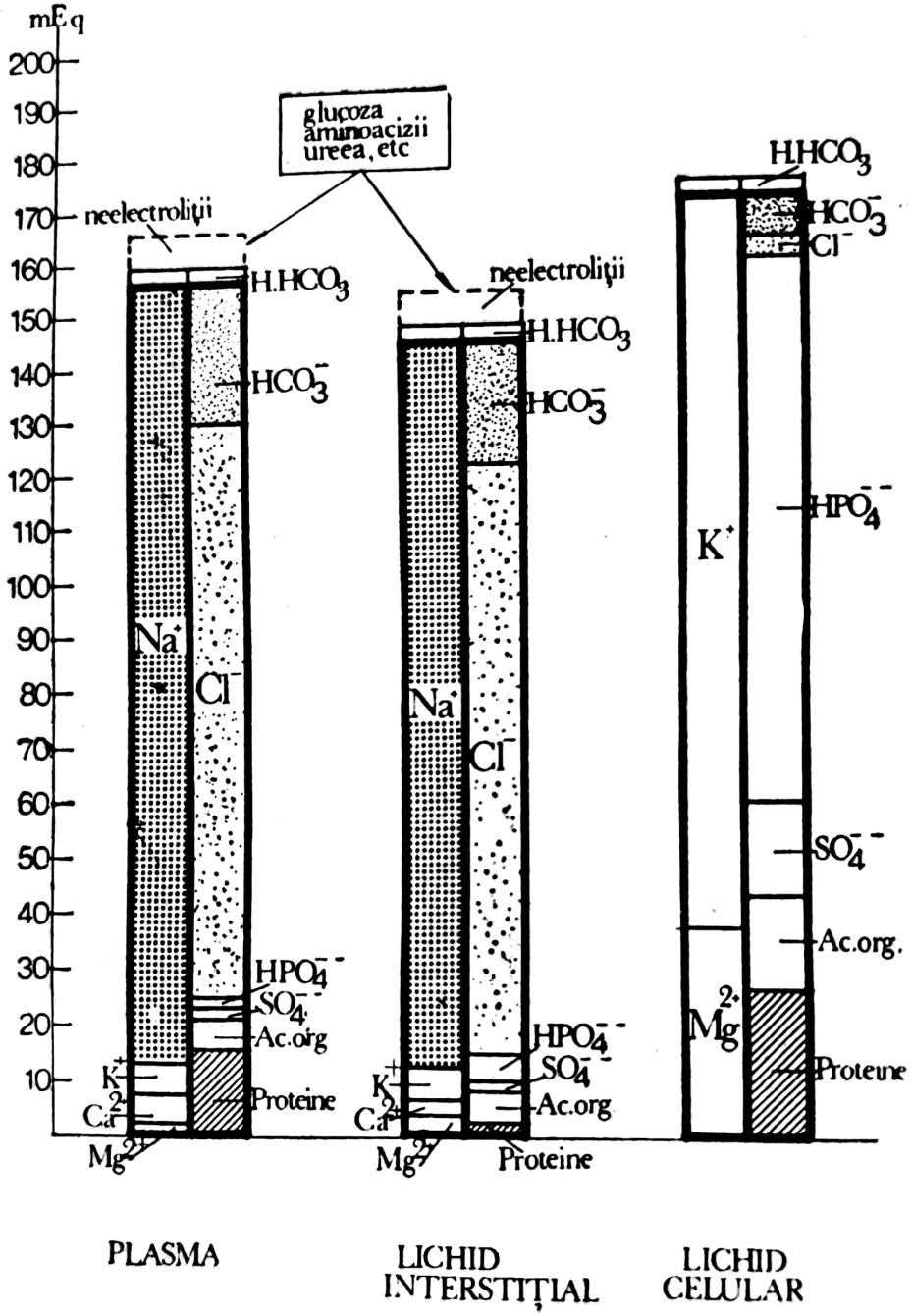


Fig. II.4. Compoziţia lichidelor intra- şi extracelulare, exprimată în miliechivalenţi/litru (după Gamble).

însuşiri, apa transportă în organism atît substanţele nutritive şi mediatorii controlului umoral, cît şi produsele de excreţie rezultate în urma diverselor metabolisme.

Apa este un metabolit universal împlinind pe de o parte, rol de reactant iar pe de altă parte, rol de produs de reacţie în numeroase şi diverse reacţii biochimice fundamentale. Astfel, digestia alimentelor şi dislocarea majorităţii constituenţilor organismului, sînt reacţii hidrolitice, deci la care apa participă

Scanned with OKEN Scanner

ca reactant. Acelaşi rol de reactant îl împlineşte apa şi în reacţiile de oxido-reducţie din organism, care sînt — de cele mai multe ori — reacţii de hidratare (fixare de apă) urmate de reacţii de dehidrogenare. De asemenea, apa participă ca reactant la hidroliza ATP-ului (şi a altor compuşi macroergici), în urma căreia se eliberează energie. De altfel, mobilizarea energiei în organism presupune şi formarea de apă la oxidarea hidrogenului în lanţul respirator; în acest caz apa este produs de reacţie.

Alături de rolurile menţionate, apa îndeplineşte şi rolul fundamental de aliment. De fapt, ea este alimentul indispensabil care asigură în organism desfăşurarea normală a metabolismului tuturor celorlalte principii nutritive.

1.3. UNELE PROPRIETĂŢI FIZICO-CHIMICE ALE APEI

Din cele menţionate anterior cu privire la rolurile structurale şi funcţionale, rezultă că apa are o importanţă esenţială pentru existenţa vieţii. Aceasta se datoreşte faptului că apa are o serie de proprietăţi fizico-chimice cu totul remarcabile, ceea ce o singularizează faţă de celelalte fluide; o face să fie un lichid cu totul aparte. În cele ce urmează sînt arătate — pe scurt — proprietăţile particulare ale apei.

1.3.1. PUNCTUL DE TOPIRE ŞI PUNCTUL DE FIERBERE

Apa, H_2O, are o temperatură de topire (p.t.) şi o temperatură de fierbere (p.f.) mult mai ridicate decît ale analogilor ei (H_2S, H_2Se, H_2Te), dihidraţii elementelor care urmează oxigenului în grupa VI principală din sistemul

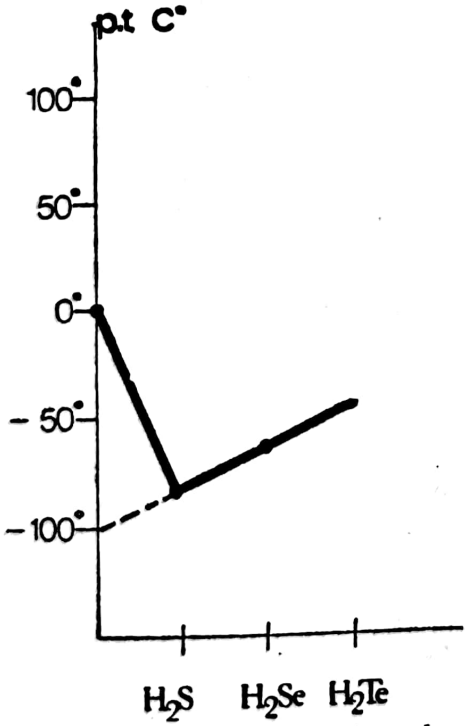


Fig. II.5. Puncte de topire ale analogilor: H_2O, H_2S, H_2Se, H_2Te.

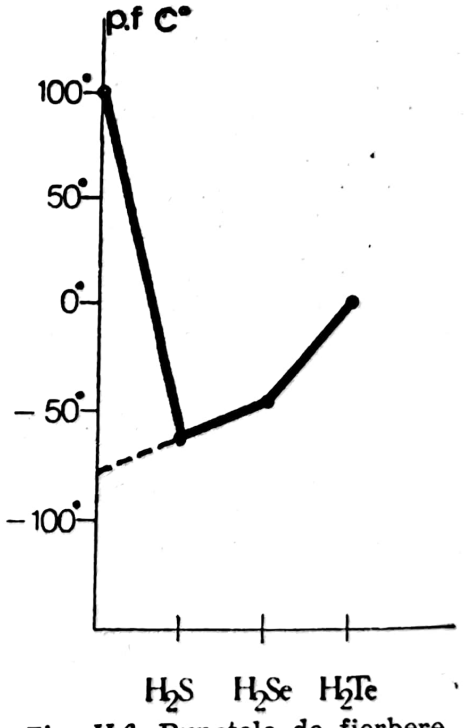


Fig. II.6. Punctele de fierbere ale analogilor: H_2O, H_2S, H_2Se, H_2Te.

periodic. Într-adevăr, aşa cum rezultă din fig. II.5 şi fig. II.6, ţinînd seama de constantele fizice respective ale combinaţiilor analoge şi extrapolînd, ar trebui ca apa să aibă p.t. — 100° şi p.f. — 80°; deci să fie în stare de vapori

Scanned with OKEN Scanner

la temperatura obişnuită. Datorită faptului că apa are punctul de topire cu 100° mai mare (0°) şi punctul de fierbere cu 180° mai ridicat (100°) decît ar trebui, ea se găseşte la temperatura obişnuită în stare lichidă şi nu în stare de vapori ca ceilalţi dihidraţi analogi. Însuşirea de a fi lichidă îi conferă rolul de mediu intern prin excelenţă.

1.3.2. CĂLDURA SPECIFICĂ ŞI CĂLDURA DE VAPORIZARE

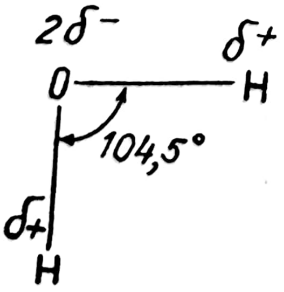
După amoniac, apa are cea mai mare căldură specifică sau capacitate termică, cum se mai numeşte. Unitatea sa de măsură este caloria (căldura specifică necesară pentru încălzirea unui gram de apă de la 14,5 la 15,5°C) sau kilocaloria (1 Kcal=1 000 cal.). Datorită faptului că această căldură specifică este mare, apa poate primi sau ceda o cantitate apreciabilă de căldură, fără a-şi schimba simţitor propria sa temperatură.

Pentru organismul viu este foarte importantă capacitatea termică ridicată a apei. Într-adevăr, dacă în mediul intern nu ar fi apa care să înmagazineze o cantitate mare de căldură fără a-şi schimba temperatura, căldura eliberată în numeroase reacţii metabolice ar determina denaturarea multor macromolecule celulare (proteine, enzime, acizi nucleici) contribuind astfel la modificarea structurii lor tridimensionale, ceea ce ar antrena pierderea unor funcţii biologice importante.

Apa are şi o căldură de vaporizare mare. (Prin căldură de vaporizare se înţelege cantitatea de căldură necesară pentru ca 1 g dintr-o substanţă să se transforme în vapori). Diverse calcule au arătat că evaporarea unui litru de apă prin piele şi prin mucoasa căilor respiratorii face ca să se piardă 580 kcal din căldura corpului. Pe de altă parte, calculele au mai arătat că organismul omului adult pierde zilnic (fără a se ţine seama de pierderile prin transpiraţie) cca 1 200 ml apă, eliberînd astfel 686 kcal (*perspiratio insensibilis*). Pierderile prin transpiraţie sînt şi ele foarte importante; în caz de efort, secreţia sudorală poate creşte pînă la 1 600 ml/oră. Dacă această cantitate de apă se evaporă total, corpul mai pierde încă 900 kcal/oră. Se înţelege că în aceste condiţii, supraîncălzirea corpului este preîntîmpinată datorită căldurii de vaporizare mare a apei; ceea ce contribuie, fără îndoială, la asigurarea desfăşurării normale a proceselor biologice din organism.

1.3.3. POLARITATEA MOLECULEI DE APĂ

Din cauza caracterului mult mai electronegativ al oxigenului comparativ cu al hidrogenului, în molecula apei (HOH) electronii celor 2 atomi de hidrogen sînt deplasaţi în preajma atomului de oxigen, molecula devenind un dipol.



Totodată ea are o structură angulară cu cele două distanţe H—O egale, de 0,96 Å şi unghiul de valenţă de 104,5°. Consecutiv, în molecula polară a apei există centre de greutate diferite ale sarcinilor electrice pozitive şi negative. Ţinînd seama de valoarea sarcinilor în centrele de greutate respective şi de distanţa dintre ele, dipolmomentul apei este 1,84 D (Debye). 1 D=10^{-18} u.e.s. x cm.

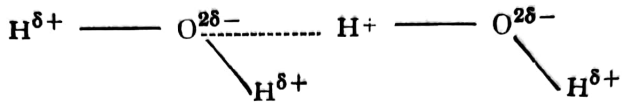
Scanned with OKEN Scanner

1.3.4. ASOCIEREA MOLECULARĂ ŞI LEGĂTURA DE HIDROGEN

Datorită faptului că sînt dipoli, moleculele de apă se asociază, grupîndu-se cîte 3, 4, 6, sau mai multe molecule, în funcţie de starea de agregare a apei.

Asocierea dintre moleculele apei nu este datorită numai unei simple atracţii electrostatice între dipoli ci şi unei adevărate legături, *legătura de hidrogen*.

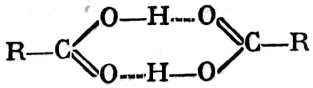
Pentru a explica formarea şi natura legăturii de hidrogen este util să se ia în considerare situaţia:



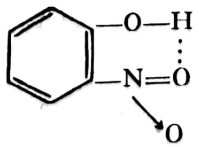
care conduce la asocierea moleculelor de apă deoarece sînt dipoli. Într-adevăr, regiunea pozitivă a unei molecule atrage şi leagă electrostatic partea negativă a altei molecule. Însă, din cauza marii afinităţi pentru electroni a oxigenului, în fiecare moleculă dubletele de legătură sînt foarte mult deplasate către atomul de oxigen şi hidrogenul este aproape lipsit de sferă electronică, aproape H^+. Din această cauză (aproape lipsit de sfera electronică şi totodată foarte mic), hidrogenul (de fapt H^+) care a fost atras de oxigenul altei molecule nu este respins de învelişul electronic al oxigenului din această moleculă ci pătrunde în domeniul lui creînd astfel o legătură de tip special, *legătura de hidrogen*, între atomul de oxigen al moleculei din care face parte şi atomul de oxigen al unei a doua molecule.

În comparaţie cu legăturile obişnuite chimice, legătura de hidrogen este slabă dar este mult mai puternică decît legăturile electrostatice care se stabilesc între dipoli. Energia cheltuită la desfacerea unei legături de hidrogen este de 4—7 kcal/mol iar cea necesară desfacerii unei legături chimice este de 50—100 kcal/mol.

Legăturile de hidrogen, sau „punţile de hidrogen" cum li se mai spune, se întîlnesc şi în alte substanţe cărora le uşurează asociaţii moleculare: alcooli, acizi organici. La aceştia din urmă asociaţiile moleculare, mijlocite de legăturile de hidrogen, se realizează astfel:



Legăturile de hidrogen pot uni grupe funcţionale deosebite din aceeaşi moleculă, ca în o-nitrofenol:



în care hidrogenul legat covalent cu oxigenul mai formează o legătură (a II-a) cu alt atom de oxigen, datorită electronegativităţii puternice a acestui atom.

Punţi de hidrogen se pot forma nu numai între atomii de oxigen ci şi între alţi atomi negativi, aşa cum se vede în tabelul II.2 în care sînt menţionate şi energiile cheltuite pentru ruperea acestor legături.

Scanned with OKEN Scanner

Tabelul II.2

Energiile unor legături de hidrogen

Legătura	Energia (kcal/mol)	Legătura	Energia (kcal/mol)
O–H.....O=	5,9	=N–H.....N<	5–6
=N–H.....O=	2–3	=N–H.....F–	4–5
–O–H.....N≡–	4–7	F–H.....F–	6–7

În biochimie, alături de legăturile de tipul —O—H·····O prezintă mult interes şi legăturile de tipul =N—H·····O; ele joacă un rol hotărîtor în determinarea structurii tridimensionale a proteinelor şi acizilor nucleici.

1.3.5. STRUCTURI CORESPUNZĂTOARE UNOR STĂRI DE AGREGARE ALE APEI

Structura apei solide. După cum s-a menţionat, numărul de molecule de apă care se asociază depinde de starea de agregare a acesteia. Astfel, în stare solidă — în gheaţă — fiecare moleculă de apă este înconjurată, în primul rînd, de alte 4 molecule, astfel încît atomii lor de oxigen să formeze un tetraedru (tetrahidrol) (fig. II.7).

Cei doi atomi de hidrogen ai moleculei centrale formează fiecare o legătură de hidrogen cu oxigenul dintr-altă moleculă de apă, iar oxigenul moleculei centrale formează legături de hidrogen cu doi atomi H din alte două molecule de apă diferite. Deoarece la vîrfurile tetraedrului se află tot molecule de apă, fiecare devine centru pentru alt tetraedru rezultînd astfel structuri spaţiale complicate, cu caracter poligonal (structură hexagonală, octaedrică, pentagondodecaedrică). În această structură a gheţii, stabilizată prin punţi de H în proporţie de 100%, unghiurile de valenţă sînt lărgite la 109,5° iar covalenţele sînt alungite la 0,99 Å.

Structura apei lichide. La topirea gheţii o parte din legăturile de H se rup, astfel că în apa lichidă apar alături de fragmente cu structură tetraedrică şi asociaţii cu structuri mai compacte. În apa lichidă există asocieri de 2—6 molecule care se desfac şi se refac continuu.

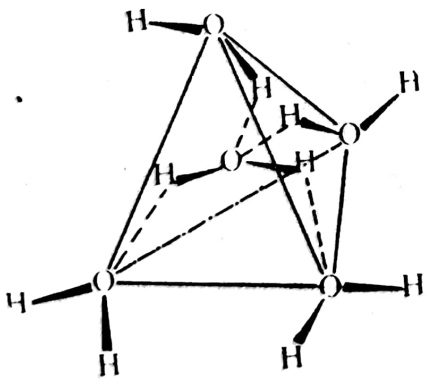


Fig. II.7. Tetrahidrol.

Structura apei în stare de vapori. În stare de vapori, apa este constituită din molecule simple, neasociate.

1.3.6. APA CA DIZOLVANT

Apa este cel mai bun şi important dizolvant. Ea dizolvă atît electroliţi (acizi, baze, săruri), cît şi compuşi neionizaţi (anorganici sau organici).

Cînd se dizolvă diversele substanţe ionizate în apă, moleculele acesteia se orientează în jurul ionilor ca în fig. II.8.

Ionii se înconjură astfel cu o „pătură" de apă. Între ioni şi dipolii apei care-i înconjură se stabilesc legături slabe de atracţie. Fenomenul numit generic

Scanned with OKEN Scanner

„solvatare" poartă în acest caz numele de „hidratare", deoarece dizolvantul este apa. Numărul de molecule de apă care hidratează o particulă încărcată electric (un ion) depinde de raza sa. Ionii cu rază mai mică leagă apa mai puternic decît ionii cu rază mai mare. Spre exemplu, ionul Na^+ nehidratat are raza 0,098 nm şi se hidratează cu 8 molecule H_2O ajungînd după hidratare

Fig. II.8. Ioni hidrataţi.

la raza de 0,24 nm, pe cînd ionul K^+ nehidratat, cu raza de 0,133 nm, se hidratează numai cu 4 molecule de apă ajungînd după hidratare la raza de 0,17 nm.

Pătura hidratantă care înconjură ionii îi împiedică să se apropie între ei, uşurîndu-le independenţa în diversele deplasări; spre exemplu, în traversarea membranelor celulare. Aceste traversări sînt diferenţiate pentru diverşii ioni, în funcţie de mărimea ionilor hidrataţi; sînt mai rapide în cazul ionilor hidrataţi cu rază mai mică şi mai lente pentru ionii hidrataţi cu rază mai mare. Datorită acestui fapt, pătrunderea ionilor hidrataţi de potasiu prin majoritatea membranelor biologice este mult mai uşoară decît a ionilor de sodiu hidrataţi. Prezenţa păturii hidratante la suprafaţa ionilor creează însă şi unele neajunsuri, în special cînd doi ioni încărcaţi electric diferit sînt solicitaţi să participe la o aceeaşi reacţie. În asemenea cazuri, combinarea ionilor încărcaţi cu sarcini electrice diferite este îngreuiată.

Multe molecule neionizate — în special, moleculele complexe de tipul proteinelor, acizilor nucleici, polizaharidelor — se pot înconjura şi ele cu molecule de apă. Se stabilesc punţi de hidrogen între macromoleculele respective şi apă. Deci şi macromoleculele, datorită structurii lor chimice (cuprinzînd grupări sau atomi susceptibili de a forma punţi de hidrogen cu apa), se pot hidrata. În soluţii apoase diluate macromoleculele reţin o parte din apă la suprafaţă, constituindu-se aşa-numita *apă legală*. Se distinge astfel în soluţie apa legată şi *apa liberă*, ultima constituind mediul în care se deplasează apa legată odată cu molecula pe care o hidratează. Existenţa apei legate, diferită de apa liberă, este evidenţiată de faptul că dacă se aduce un ţesut animal sau vegetal la o temperatură foarte scăzută (cuprinsă între —20° şi —60°), se constată că o parte din apă se transformă în gheaţă; aceasta este apa legată de moleculele proteice sau ale altor constituenţi citoplasmatici.

Prin intermediul apei legate se pot stabili diverse schimbări între molecule şi apa liberă. Aceste fenomene de schimb au loc în permanenţă; de exemplu, între ionii constitutivi ai osului şi cei corespunzători din plasmă, în special ionii de calciu şi fosfat. De asemenea, în structurile hidratate legăturile de H pot trece în legături covalente şi invers. Spre exemplu, dacă se introduc într-un asemenea sistem protoni, poate avea loc o eliberare corespunzătoare

Scanned with OKEN Scanner

Tabelul II.2

Energiile unor legături de hidrogen

Legătura	Energia (kcal/mol)	Legătura	Energia (kcal/mol)
O—H.....O=	5,9	=N—H.....N<	5—6
=N—H.....O=	2—3	=N—H.....F—	4—5
—O—H.....N≡—	4—7	F—H.....F—	6—7

În biochimie, alături de legăturile de tipul —O—H·····O prezintă mult interes şi legăturile de tipul =N—H·····O; ele joacă un rol hotărîtor în determinarea structurii tridimensionale a proteinelor şi acizilor nucleici.

1.3.5. STRUCTURI CORESPUNZĂTOARE UNOR STĂRI DE AGREGARE ALE APEI

Structura apei solide. După cum s-a menţionat, numărul de molecule de apă care se asociază depinde de starea de agregare a acesteia. Astfel, în stare solidă — în gheaţă — fiecare moleculă de apă este înconjurată, în primul rînd, de alte 4 molecule, astfel încît atomii lor de oxigen să formeze un tetraedru (tetrahidrol) (fig. II.7).

Cei doi atomi de hidrogen ai moleculei centrale formează fiecare o legătură de hidrogen cu oxigenul dintr-altă moleculă de apă, iar oxigenul moleculei centrale formează legături de hidrogen cu doi atomi H din alte două molecule de apă diferite. Deoarece la vîrfurile tetraedrului se află tot molecule de apă, fiecare devine centru pentru alt tetraedru rezultînd astfel structuri spaţiale complicate, cu caracter poligonal (structură hexagonală, octaedrică, pentagondodecaedrică). În această structură a gheţii, stabilizată prin punţi de H în proporţie de 100%, unghiurile de valenţă sînt lărgite la 109,5° iar covalenţele sînt alungite la 0,99 Å.

Structura apei lichide. La topirea gheţii o parte din legăturile de H se rup, astfel că în apa lichidă apar alături de fragmente cu structură tetraedrică şi asociaţii cu structuri mai compacte. În apa lichidă există asocieri de 2—6 molecule care se desfac şi se refac continuu.

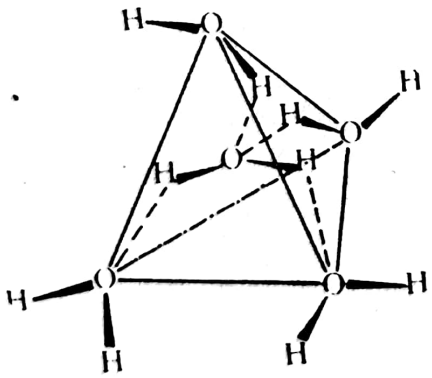


Fig. II.7. Tetrahidrol.

Structura apei în stare de vapori. În stare de vapori, apa este constituită din molecule simple, neasociate.

1.3.6. APA CA DIZOLVANT

Apa este cel mai bun şi important dizolvant. Ea dizolvă atît electroliţi (acizi, baze, săruri), cît şi compuşi neionizaţi (anorganici sau organici).

Cînd se dizolvă diversele substanţe ionizate în apă, moleculele acesteia se orientează în jurul ionilor ca în fig. II.8.

Ionii se înconjură astfel cu o „pătură" de apă. Între ioni şi dipolii apei care-i înconjură se stabilesc legături slabe de atracţie. Fenomenul numit generic

Scanned with OKEN Scanner

„solvatare" poartă în acest caz numele de „hidratare", deoarece dizolvantul este apa. Numărul de molecule de apă care hidratează o particulă încărcată electric (un ion) depinde de raza sa. Ionii cu rază mai mică leagă apa mai puternic decît ionii cu rază mai mare. Spre exemplu, ionul Na^+ nehidratat are raza 0,098 nm şi se hidratează cu 8 molecule H_2O ajungînd după hidratare

Fig. II.8. Ioni hidrataţi.

la raza de 0,24 nm, pe cînd ionul K^+ nehidratat, cu raza de 0,133 nm, se hidratează numai cu 4 molecule de apă ajungînd după hidratare la raza de 0,17 nm.

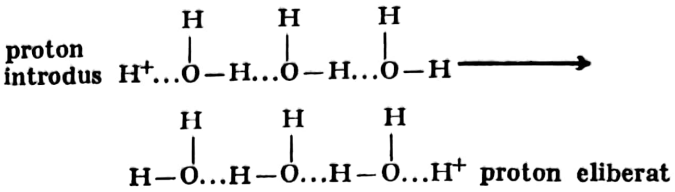
Pătura hidratantă care înconjură ionii îi împiedică să se apropie între ei, uşurîndu-le independenţa în diversele deplasări; spre exemplu, în traversarea membranelor celulare. Aceste traversări sînt diferenţiate pentru diverşii ioni, în funcţie de mărimea ionilor hidrataţi; sînt mai rapide în cazul ionilor hidrataţi cu rază mai mică şi mai lente pentru ionii hidrataţi cu rază mai mare. Datorită acestui fapt, pătrunderea ionilor hidrataţi de potasiu prin majoritatea membranelor biologice este mult mai uşoară decît a ionilor de sodiu hidrataţi. Prezenţa păturii hidratante la suprafaţa ionilor creează însă şi unele neajunsuri, în special cînd doi ioni încărcaţi electric diferit sînt solicitaţi să participe la o aceeaşi reacţie. În asemenea cazuri, combinarea ionilor încărcaţi cu sarcini electrice diferite este îngreuiată.

Multe molecule neionizate — în special, moleculele complexe de tipul proteinelor, acizilor nucleici, polizaharidelor — se pot înconjura şi ele cu molecule de apă. Se stabilesc punţi de hidrogen între macromoleculele respective şi apă. Deci şi macromoleculele, datorită structurii lor chimice (cuprinzînd grupări sau atomi susceptibili de a forma punţi de hidrogen cu apa), se pot hidrata. În soluţii apoase diluate macromoleculele reţin o parte din apă la suprafaţă, constituindu-se aşa-numita *apă legată*. Se distinge astfel în soluţie apa legată şi *apa liberă*, ultima constituind mediul în care se deplasează apa legată odată cu molecula pe care o hidratează. Existenţa apei legate, diferită de apa liberă, este evidenţiată de faptul că dacă se aduce un ţesut animal sau vegetal la o temperatură foarte scăzută (cuprinsă între —20° şi —60°), se constată că o parte din apă se transformă în gheaţă; aceasta este apa legată de moleculele proteice sau ale altor constituenţi citoplasmatici.

Prin intermediul apei legate se pot stabili diverse schimbări între molecule şi apa liberă. Aceste fenomene de schimb au loc în permanenţă; de exemplu, între ionii constitutivi ai osului şi cei corespunzători din plasmă, în special ionii de calciu şi fosfat. De asemenea, în structurile hidratate legăturile de H pot trece în legături covalente şi invers. Spre exemplu, dacă se introduc într-un asemenea sistem protoni, poate avea loc o eliberare corespunzătoare

Scanned with OKEN Scanner

de protoni, asemănătoare unui transport, fără să existe însă o deplasare efectivă a aceluiaşi proton:



O comportare particulară faţă de apă o au substanţele amfipatice caracterizate prin afinitate dublă: pentru apă şi pentru solvenţi apolari. Substanţele amfipatice se orientează cu grupările polare (hidrofile) spre apă, interacţionînd cu ea şi cu cele hidrofobe se orientează spre solvenţi apolari. Aşa se explică dispunerea substanţelor amfipatice (spre exemplu, acizii graşi cu molecule mari) sub formă de filme la suprafaţa apei.

1.3.7. IONIZAREA APEI ŞI PRODUSUL IONIC AL APEI

Deşi apa pură complet lipsită de săruri şi gaze dizolvate este considerată neelectrolit, ea conduce totuşi curentul electric: la 25° conductibilitatea specifică a apei este de 6×10^{-8} $ohm^{-1} \times cm^{-1}$.

Se admite că această conductibilitate electrică a apei se datoreşte faptului că o parte din moleculele ei sînt ionizate. Deoarece în mediu apos ionul H^+ nu este liber ci ataşat unei molecule de apă — constituind astfel ionul hidroniu, H_3O^+ — ionizarea apei poate fi scrisă conform ecuaţiei:

$$2\,HOH \rightleftharpoons H_3O^+ + HO^-$$

La 25°, apa se află ionizată în proporţie de 1 moleculă la 555 milioane de molecule. Constanta de echilibru a reacţiei de ionizare a apei este definită prin relaţia:

$$K_e = \frac{[H_3O^+][HO^-]}{[HOH]^2}$$

Această relaţie este valabilă nu numai pentru apa pură ci şi pentru soluţiile acizilor şi bazelor. Dacă, pentru un moment, reacţia ajunge să nu mai fie satisfăcută din cauza variaţiei uneia sau alteia dintre concentraţiile $[H^+]$ sau $[HO^-]$, reacţia:

$$H_3O^+ + HO^- \rightleftharpoons 2\,HOH$$

se desfăşoară cu viteză crescîndă într-o direcţie sau în cealaltă, pînă cînd echilibrul este restabilit.

De vreme ce apa este foarte puţin ionizată — abia 1 moleculă la 555 milioane — concentraţia apei neionizate este aproape egală cu concentraţia totală a apei, care în apă şi în soluţiile apoase diluate este de 55,5 molecule-gram/litru. Ţinîndu-se seama de acest fapt, se poate admite că în ecuaţia care defineşte constanta de ionizare a apei, concentraţia apei neionizate $[HOH]^2$ este constantă şi se va trece în membrul al doilea al ecuaţiei:

$$[H_3O^+] \times [HO^-] = K_e[HOH]^2 = K_{H_2O}$$

Scanned with OKEN Scanner

Această expresie definește mărimea numită *produsul ionic al apei* K_{H_2O} egal cu produsul concentrației ionilor hidroniu (aceeași cu concentrația ionilor de hidrogen) prin concentrația ionilor hidroxil. La temperatura de 25°, produsul ionic al apei are valoare 10^{-14}, ceea ce înseamnă că în apa pură, la 25°, concentrația ionilor de hidroniu, egală cu cea a ionilor hidroxil, este 10^{-7} iongram/litru:

$$[H_3O^+]=[HO^-]=10^{-7}$$

Produsul ionic al apei crește cu temperatura dar la aceeași temperatură el este invariabil, nu numai pentru apa pură ci și pentru orice soluție apoasă, deajuns de diluată.

2. REACȚIA SOLUȚIILOR

2.1. SIMBOLURILE $[H^+]$ ȘI $[HO^-]$

O soluție este neutră, ca apa pură, cînd cuprinde ioni H^+ și ioni OH^- în aceeași concentrație. La 25°, în apa pură și în soluțiile neutre,

$$[H^+]=[HO^-]=10^{-7}.$$

În genere, se spune că o soluție are reacție acidă cînd cuprinde o cantitate oarecare de acid liber (necombinat) și că are reacție bazică cînd cuprinde o cantitate de bază necombinată. În soluțiile acide concentrația ionilor H^+ este mai mare ca în apa pură și — implicit — decît concentrația ionilor HO^-. În soluțiile bazice situația este inversată. La 25°, avem deci:

pentru soluții acide: $[H^+]>10^{-7}>[HO^-]$

pentru soluții bazice: $[HO^-]>10^{-7}>[H^+]$

Relațiile acestea arată că aciditatea unei soluții este caracterizată cantitativ (este măsurată) de concentrația ionilor H^+ din soluție iar bazicitatea unei soluții este măsurată de concentrația ionilor HO^- din soluție.

Însă, între concentrația ionilor H^+ și HO^- există relația dată de produsul ionic al apei:

$$[H^+][HO^-]=10^{-14} \qquad \text{(la 25°)}.$$

Aceasta arată că fiecărei concentrații a ionilor HO^- îi corespunde o concentrație unică, bine determinată, a ionilor H^+, dată de relația:

$$[H^+]=\frac{10^{-14}}{[HO^-]}=\frac{1}{10^{14}[HO^-]}$$

Prin urmare, așa cum se caracterizează acidițățile cu ajutorul concentrației ionilor H^+, se pot caracteriza și bazicitățile tot cu ajutorul concentrației ionilor H^+; anume, în soluții bazice $[H^+]<10^{-7}$.

Ținîndu-se seama de acest fapt, se poate scrie:

în soluții *acide* $[H^+]>10^{-7}$

în soluții *neutre* $[H^+]=10^{-7}$

în soluții *bazice* $[H^+]<10^{-7}$

Scanned with OKEN Scanner

2.2. SIMBOLURILE pH, pOH ŞI pK

Concentraţiile ionilor de hidrogen — care se determină cel mai frecvent şi care sînt utilizate de obicei în biochimie — sînt cuprinse între 1 şi 10^{-14} (respectiv, concentraţia ionilor H^+ într-o soluţie normală de acid tare şi concentraţia lor într-o soluţie normală de bază tare).

Folosirea valorilor concentraţiei ionilor H^+, care se scriu ca puteri negative ale lui 10 ($A \times 10^{-4}$) este însă incomodă. De aceea, pentru precizarea reacţiei soluţiilor se foloseşte în locul concentraţiei ionilor H^+, logaritmul cu semn schimbat al concentraţiei $[H^+]$, desemnat cu simbolul pH, care este o prescurtare a expresiei *pondus hidrogenii* (=puterea hidrogenului). Oricărei concentraţii a ionilor H^+ îi corespunde o valoare pH bine determinată, definită de ecuaţia:

$$pH = -\log [H^+]$$

Potrivit definiţiei logaritmilor (zecimali), valorile pH sînt puteri la care trebuie să fie ridicat 10, baza logaritmilor zecimali, pentru ca să se obţină concentraţiile corespunzătoare ale ionilor de hidrogen:

$$10^{-pH} = [H^+]$$

Deoarece $pH = -\log [H^+]$, valorilor concentraţiei ionilor de hidrogen care sînt mai mari decît 10^{-7} le corespund valori pH mai mici decît 7 şi care scad cînd concentraţia creşte.

Concentraţiei ionilor de hidrogen 10^{-7} îi corespunde $pH = 7$ iar valorilor concentraţiei ionilor de hidrogen mai mici decît 10^{-7} le corespund valori pH mai mari decît 7; cu atît mai mari, cu cît soluţiile sînt mai bazice. Aşadar:

pentru soluţii acide $pH < 7$,

pentru soluţii neutre $pH = 7$,

pentru soluţii bazice $pH > 7$.

Aceleaşi motive care au condus la introducerea mărimii pH au determinat şi folosirea valorii pOH în locul concentraţiei ionilor HO^-. Deci:

$$pOH = -\log [HO^-]$$

de unde:

$$[HO^-] = 10^{-pOH}$$

Ţinîndu-se seama şi de expresia pOH, rezultă că pentru definirea reacţiei unei soluţii se pot folosi 4 mărimi, cele din coloana „simbol" a tabelului II.3.

De asemenea, şi pentru alte valori foarte mici — spre exemplu, cele prin care se caracterizează constantele de aciditate, constantele de echilibru — exprimate tot prin puteri negative ale lui 10 — s-au introdus notaţii pondus, $pK = -\log K$. Astfel, constanta de aciditate a acidului acetic, $K = 1{,}8 \times 10^{-5}$, are valoarea $pK = 4{,}78$.

Folosindu-se în locul concentraţiei H^+ şi HO^- mărimile corespunzătoare pH şi pOH, se poate da o nouă formulare relaţiei care defineşte produsul ionic al apei: $pH + pOH = 14$; această formă de exprimare pentru produsul ionic al apei permite aflarea valorii pH cînd se cunoaşte pOH şi invers.

În legătură cu definirea reacţiei soluţiilor, utilizînd oricare din simbolurile menţionate în tabelul II.3, este de făcut următoarea precizare: unei modificări

Scanned with OKEN Scanner

cu o unitate a valorii pH-ului îi corespund variaţii foarte mult diferite ale cantităţii de ioni hidrogen şi anume îi corespund variaţii mari cînd valorile pH sînt mici şi variaţii infime cînd valorile pH sînt mari. Într-adevăr, cînd pH-ul unei soluţii scade de la 3 la 2 (deci cu o unitate), cantitatea de ioni hidrogen din soluţie creşte mult mai mult decît atunci cînd pH-ul scade de

Tabelul II.3

Simbolurile utilizate pentru aprecierea reacţiei unei soluţii

Simbol (mărime)	Reacţie		
	acidă	neutră	alcalină
$[H^+]=[H_3O^+]$	$>10^{-7}$	$=10^{-7}$	$<10^{-7}$
$[HO^-]$	$<10^{-7}$	$=10^{-7}$	$>10^{-7}$
pH	< 7	$= 7$	>7
pOH	> 7	$= 7$	<7

la 9 la 8 (tot cu o unitate). În primul caz, concentraţia ionilor de hidrogen trece de la valoarea 1/1 000 la 1/100 (=10/1 000), deci cantitatea de ioni hidrogen în 1 litru de soluţie creşte cu 9/1 000 gram iar în al doilea caz concentraţia creşte de la $1/10^9$ la $1/10^8$ ($=10/10^9$), deci cantitatea de ioni hidrogen din 1 litru creşte abia cu $9/10^9$ (de 1 milion de ori mai puţin). Pentru acest motiv se foloseşte o cantitate mai mare de bază ca să crească pH-ul unei soluţii acide de la valoarea 2 la 3 şi o cantitate incomparabil mai mică pentru ca să crească pH-ul unei soluţii bazice de la 8 la 9.

Pe de altă parte, scăderea la jumătate sau dublarea concentraţiei ionilor hidrogen dintr-un mediu se manifestă prin creşterea, respectiv scăderea, valorilor pH corespunzătoare cu cîte 0,30 unităţi. Acest fapt rezultă imediat din tabelul II.4.

Tabelul II.4

Concentraţiile ionilor şi valorile pH corespunzătoare ale unor soluţii

$[H^+]$ nmol/litru	pH	$[H^+]$ nmol/litru	pH
20	7,70	60	7,22
25	7,60	70	7,16
30	7,52	80	7,10
35	7,46	100	7,00
40	7,40	120	6,92
50	7,30	140	6,86
		160	6,80

Valorile pH ale unor lichide din organism precum şi ale unor lichide folosite în mod curent (în special, în alimentaţie) sînt consemnate în figura II.9.

Din figura II.9 reiese că valoarea pH(=7) a apei pure diferă de cea a sucului pancreatic (=8) cu o unitate aşa cum diferă şi pH-ul sucului gastric ($\simeq 2$) de cel al sucului de lămîie ($\simeq 3$). Însă apreciind cu ajutorul concentraţiei ionilor de hidrogen aceste valori, reiese că diferenţa de 1 unitate de pH între sucul pancreatic şi apa pură corespunde la 90 nmol $[H^+]/1$ pe cînd diferenţa

Scanned with OKEN Scanner

de aciditate dintre sucul de lămîie şi sucul gastric (corespunzătoare tot unei unităţi de pH) este de 9 nmol $[H^+]/l$ sau 9 milioane nmol; deci de 100 000 ori mai mare. Cele menţionate aici precum şi datele din exemplele anterioare, arată că unitatea pH nu are aceeaşi valoare în toate regiunile scării de pH

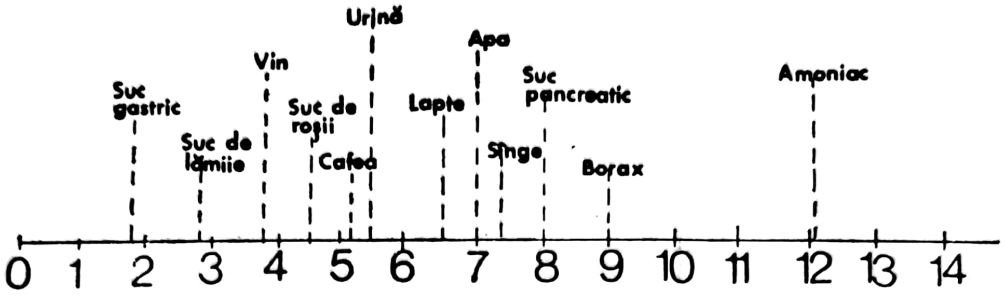


Fig. II.9. Valorile pH ale unor lichide cunoscute.

cînd este apreciată în concentraţie de ioni hidrogen. Toate acestea dovedesc, încă o dată, că între pH şi $[H^+]$ există o relaţie logaritmică şi nu lineară.

Caracterizarea reacţiei (acidă, neutră sau alcalină) a unei soluţii se poate face cu mare precizie utilizîndu-se diverse metode electrochimice sau metoda colorimetrică pentru determinarea pH-ului. Metoda colorimetrică este folosită în mare măsură în laboratoarele de biochimie. Principiul acestei metode pentru determinarea pH-ului unei soluţii este menţionat mai departe, după prezentarea datelor importante privind sistemele tampon şi indicatorii, substanţe utilizate în efectuarea metodei colorimetrice.

3. ACIZII ŞI BAZELE

Pentru definirea acizilor şi bazelor există diverse concepţii. Dintre ele, cea folosită mai mult în studiile biochimice şi medicale este cea propusă, în 1923, de J. N. Brönsted şi T. M. Lowry.

Potrivit teoriei Brönsted-Lowry, acizii sînt specii chimice constituite din molecule sau ioni care pot ceda protoni iar bazele sînt specii de molecule sau ioni care pot accepta protoni.

Deoarece o bază nu poate accepta (fixa) protoni decît dacă există un acid care să-i cedeze, înseamnă că eliberarea de protoni de către un acid este cuplată cu fixarea lor de către o bază. Procesul este reversibil şi poate fi scris astfel:

$$\text{Acid} \rightleftharpoons H^+ + \text{Bază}.$$

Din această relaţie rezultă că fiecărui acid îi corespunde o bază cu care este interconvertibil prin transfer de protoni. Se spune, în acest caz, că baza este *conjugată* cu acidul corespunzător, constituind împreună o pereche simplă de conjugaţi acid-bază. În tabelul II.5 figurează cîteva asemenea perechi.

Din examinarea tabelului II.5 rezultă că există două feluri de acizi: cei constituiţi din molecule neutre, numiţi *acizi fără sarcină* şi acizii la care dau naştere bazele prin acceptare de protoni (NH_4^+, $H_2N-NH_3^+$, $R-NH_3^+$), numiţi *acizi cationici*. De asemenea, există două feluri de baze: unele sînt sub-

Scanned with OKEN Scanner

Tabelul II.5

Perechi conjugate acid-bază

	Acizi	Baze
1.	$HCl + HOH$	$H^+ + Cl^-$
2.	$HNO_3 + HOH$	$H^+ + NO_3^-$
3.	$H_2SO_4 + HOH$	$H^+ + HSO_4^-$
4.	$H_3PO_4 + HOH$	$H^+ + H_2PO_4^-$
5.	$H_2CO_3 + HOH$	$H^+ + HCO_3^-$
6.	$CH_3-COOH + HOH$	$H^+ + CH_3-COO^-$
7.	$HOOC-COOH + HOH$	$H^+ + HOOC-COO^-$
8.	$NH_4^+ + HOH$	$H^+ + NH_3$
9.	$H_2N-NH_3^+ + HOH$	$H^+ + H_2N-NH_2$
10.	$R-NH_3^+ + HOH$	$H^+ + R-NH_2$

stanțe neutre din punct de vedere electric ca: amoniacul, hidrazina și aminele iar altele sînt anioni formați din acizi prin pierderea de protoni: Cl^-, HSO_4^-, CH_3-COO^-, etc. Primele sînt *baze fără sarcină* iar cele din urmă *baze anionice.*

3.1. REACȚII PROTOLITICE

În sistemele chimice sau biochimice nu există niciodată protoni liberi, în cantitate apreciabilă. Totdeauna protonii eliberați de acizi (fără sarcină sau cationici) sînt cedați unei baze (anionice sau fără sarcină), reacția conducînd la transformarea acidului în bază și a bazei în acid, așa cum se poate observa în ecuația următoare:

$$\underset{\text{acid}}{HCl} + \underset{\text{bază}}{NH_3} \rightleftharpoons \underset{\text{bază}}{Cl^-} + \underset{\text{acid}}{NH_4^+}$$

Toate reacțiile la care participă, ca atare, acizii și bazele sînt de tipul reprezentat prin ecuația generală:

$$\text{Acid}_1 + \text{Bază}_2 \rightleftharpoons \text{Bază}_1 + \text{Acid}_2$$

și se numesc *reacții protolitice.*

În ecuația generală a reacțiilor protolice substanțele $Acid_1$ și $Bază_1$ constituie o pereche simplă de conjugați iar substanțele $Acid_2$ și $Bază_2$, o altă pereche de conjugați:

$$\text{Acid}_1 \rightleftharpoons H^+ + \text{Bază}_1$$

$$\text{Bază}_2 + H^+ \rightleftharpoons \text{Acid}_2$$

Așadar, reacțiile protolitice sînt specifice acizilor și bazelor; în ele se mobilizează protoni și participă — în mod obligator — două perechi simple de conjugați acid-bază. Datorită existenței reacțiilor protolitice la care participă acizii și bazele, concepția Brönsted-Lowry este numită adesea și *teoria protolitică a acizilor și bazelor.*

Scanned with OKEN Scanner

Apa reacționează protolitic conform ecuației:

$$HOH + HOH \rightleftharpoons HO^- + H_3O^+$$

Și în acest caz la reacție participă două perechi simple de conjugați acid-bază. Moleculele HOH sînt $acidul_1$ și $baza_2$ iar conjugații lor $baza_1$ și $acidul_2$ sînt respectiv, HO^- și H_3O^+.

Reacțiile protolitice de acest fel în care aceeași substanță joacă rol atît de acid cît și de bază se numesc *reacții autoprotolitice*; ele reprezintă un caz particular al reacțiilor protolitice.

Deoarece apa poate funcționa atît ca acid cît și ca bază, ea aparține categoriei amfoliților.

3.2. AMFOLIȚII

Amfoliții sînt substanțe care funcționează fie ca acizi, fie ca baze, după natura mediului în care se află. În această categorie de substanțe intră unele baze anionice, de felul: HSO_4^-, $H_2PO_4^-$, HCO_3^-, provenite din acizii polivalenți respectivi (vezi tabelul II.6), precum și unii acizi cationici, proveniți din bazele polivalente corespunzătoare (ultimele două exemple din tabelul II.6).

Tabelul II.6

Cedarea și acceptarea protonilor de către amfoliți

Baze		Amfoliți		Acizi
SO_4^{2-}	$\xleftarrow{-H^+}$	HSO_4^-	$\xrightarrow{+H^+}$	H_2SO_4
HPO_4^{2-}	$\xleftarrow{-H^+}$	$H_2PO_4^-$	$\xrightarrow{+H^+}$	H_3PO_4
PO_4^{3-}	$\xleftarrow{-H^+}$	HPO_4^{2-}	$\xrightarrow{+H^+}$	$H_2PO_4^-$
CO_3^{2-}	$\xleftarrow{-H^+}$	HCO_3^-	$\xrightarrow{+H^+}$	H_2CO_3
H_2N-NH_2	$\xleftarrow{-H^+}$	$H_2N-NH_3^+$	$\xrightarrow{+H^+}$	$H_3N^+-NH_3^+$
$H_2N-(CH_2)_2-NH_2$	$\xleftarrow{-H^+}$	$H_2N-(CH_2)_2-NH_3^+$	$\xrightarrow{+H^+}$	$H_3N^+-(CH_2)_2-NH_3^+$

O serie de alte substanțe lichide sînt și ele amfoliți. Aceste substanțe se ionizează prin reacții autoprotolitice:

$$NH_3 + NH_3 \rightleftharpoons NH_4^+ + NH_2^-$$

$$HNO_3 + HNO_3 \rightleftharpoons H_2NO_3 + NO_3^-$$

$$CH_3-COOH + CH_3-COOH \rightleftharpoons CH_3-COOH_2^+ + CH_3-COO^-$$

$$CH_3OH + CH_3OH \rightleftharpoons CH_3-OH_2^+ + CH_3O^-$$

După natura mediului în care se află, aminoacizii pot funcționa și ei ca acizi sau baze:

$$R-\underset{\displaystyle NH_3^+}{\underset{|}{CH}}-COOH \xleftarrow{+H} R-\underset{\displaystyle NH_3^+}{\underset{|}{CH}}-COO^- \xrightarrow{+HO^-} R-\underset{\displaystyle NH_2}{\underset{|}{CH}}-COO^- + H_2O$$

Deci aminoacizii sînt amfoliți.

Scanned with OKEN Scanner

Tot ca amfoliți trebuie privite și unele substanțe organice cu molecule mari — importante din punct de vedere biochimic — care cuprind în structura lor grupe de atomi ce pot funcționa ca acid sau ca bază. Spre exemplu, proteinele și unele lipide complexe.

3.3. TĂRIA ACIZILOR ȘI BAZELOR

Din definițiile acizilor și bazelor date de Brönsted și Lowry în teoria protolitică, rezultă imediat că un acid este cu atît mai tare cu cît are o tendință mai puternică să cedeze protoni iar o bază este cu atît mai tare cu cît tinde să accepte (să lege) protoni. Însă tendința de a ceda protoni a unui acid depinde de tendința de a accepta protoni a bazei cu care el reacționează. De aceea, tăriile diferiților acizi nu pot fi comparate decît dacă au fost stabilite, luîndu-se în considerație reacțiile acizilor cu o aceeași bază. De asemenea, nici tăriile bazelor nu pot să fie comparate decît dacă au fost evaluate față de un același acid.

În biochimie și în medicină prezintă mult interes comportările acizilor și bazelor în soluții apoase deoarece mediul intern poate fi asimilat perfect cu o soluție apoasă complexă.

Pentru motivele arătate mai sus, tăriile acizilor și bazelor sînt stabilite luîndu-se în considerație modul în care se comportă aceste substanțe față de apă care, după cum s-a văzut, reacționează ca bază față de acizi și ca acid față de baze:

$$\text{(a)}\quad AH + HOH \rightleftharpoons A^- + H_3O^+$$

$$\text{(b)}\quad B + HOH \rightleftharpoons BH^+ + HO^-.$$

Un acid AH este cu atît mai tare cu cît echilibrul în reacția (a) precedentă este mai favorabil rezultanților (este mai deplasat spre dreapta). Prin urmare, tăria acidului este caracterizată de constanta de echilibru:

$$\frac{[A^-] \times [H_3O^+]}{[AH] \times [HOH]} = K_{ech.}$$

Acidul este cu atît mai tare, cu cît constanta K_{ech} este mai mare.

Expresia care definește constanta de echilibru poate să fie simplificată. Într-adevăr, concentrația apei neionizate este practic invariabilă și egală cu 55,5 (cînd, ca de obicei, soluțiile nu sînt prea concentrate). Prin urmare, această valoare poate să fie înglobată în constantă:

$$\frac{[A^-] \times [H_3O^+]}{[AH]} = K_{ech} \times 55{,}5 = K_a$$

Noua constantă K_a este numită constantă de aciditate și măsoară tăria acidului.

În privința tăriei acizilor este de remarcat că acizii tari cedează protoni mai ușor decît ionul hidroniu, așa încît în reacția protolică:

$$AH + HOH \rightleftharpoons A^- + H_3O^+,$$

Scanned with OKEN Scanner

echilibrul este deplasat practic complet spre dreapta. Bineînțeles, bazele A⁻ conjugate cu acizii tari sînt baze numai principial (în soluție apoasă) căci ele nu fixează protoni practic deloc. Din cele menționate rezultă că pentru acizii tari constantele de aciditate nu au sens.

Tăria bazelor se definește plecînd de la reacția protolitică (b). Un raționament similar celui privind tăria acizilor duce la concluzia că o bază B este cu atît mai tare cu cît constanta de echilibru a reacției (b), scrisă anterior, este mai mare. Constanta este dată de ecuația:

$$\frac{[BH^+]\times[HO^-]}{[B]\times[HOH]} = K_{ech}.$$

Și de data aceasta concentrația apei neionizate poate fi înglobată în constantă iar noua constantă, ce se obține astfel, este numită constantă de bazicitate și este notată cu simbolul K_b:

$$\frac{[BH^+]\times[HO^-]}{[B]} = K_{ech}\times 55{,}5 = K_b.$$

Tăria bazelor nu se caracterizează de obicei cu ajutorul constantelor de bazicitate. Dimpotrivă, pentru motive care se vor arăta ulterior, tăriile acizilor și bazelor se caracterizează în mod curent cu ajutorul unui singur fel de valori (definind condiția de echilibru cu ionii de hidrogen pentru fiecare substanță). Acest parametru unic cu care se face caracterizarea tăriei acizilor și bazelor este K_a = constanta de aciditate: pentru acid, cea proprie lui iar pentru bază, constanta de aciditate a acidului conjugat. Într-adevăr, fiecărei baze îi corespunde un acid conjugat a cărei tărie este invers proporțională cu tăria bazei; spre exemplu, tăria amoniacului este definită de constanta de aciditate a ionului amoniu.

Interdependența dintre tăriile conjugaților trebuie înțeleasă în felul următor: cu cît o bază (B sau A^-) leagă mai puternic protoni, deci este mai tare, cu atît acidul ei conjugat (BH^+ sau AH) cedează protoni mai greu, este mai slab. Relația cantitativă care există între constanta de bazicitate a bazei și constanta de aciditate a conjugatului ei, este :

$$K_a\times K_b = [H_3O^+]\times[HO^-] = 10^{-14} \quad \text{(la 25°)}.$$

Această relație permite să se obțină imediat constanta corespunzătoare unui conjugat dacă se cunoaște aceea care definește tăria celuilalt:

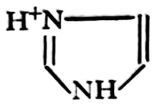
$$K_b = \frac{10^{-14}}{K_a} \text{ și } K_a = \frac{10^{-14}}{K_b}$$

Acizii a căror constantă de aciditate este mai mare decît 10^{-1} sînt acizi tari; cei cu constantă de aciditate cuprinsă între valorile 10^{-1} și 10^{-5} sînt acizi de tărie mijlocie iar cei cu constantă de aciditate mai mică decît 10^{-5} sînt acizi slabi. Dacă în locul valorilor constantelor de aciditate, exprimate prin puteri negative ale lui 10, se folosesc logaritmii lor negativi, se obțin valorile pK_a respective ($pK_a = -\log K_a$). Ținîndu-se seama de acest simbol, acizii tari au pK_a mai mic decît 1, acizii mijlocii au pK_a cuprins între 1 și 5 iar acizii slabi au pK_a mai mare ca 5.

Scanned with OKEN Scanner

Tabelul II.7

Valorile constantelor de aciditate (K_a şi pK_a) ale unor acizi importanţi din punct de vedere biochimic sau fiziologic, determinate la temperatura de 25°C

Acid	K_a	pK_a
H_2CO_3	$3{,}47 \times 10^{-7}$	6,46
HCO_3^-	$4{,}79 \times 10^{-11}$	10,32
H_3PO_4	$7{,}11 \times 10^{-3}$	2,15
$H_2PO_4^-$	$1{,}20 \times 10^{-7}$	6,92
HPO_4^{2-}	$1{,}80 \times 10^{-12}$	11,74
CH_3-COOH	$1{,}80 \times 10^{-5}$	4,73
$CH_3-CHOH-CH_2-COOH$	$4{,}07 \times 10^{-5}$	4,39
NH_4^+	$4{,}39 \times 10^{-10}$	9,21
	$9{,}10 \times 10^{-8}$	7,04

Majoritatea acizilor cu mare însemnătate metabolică, aflaţi în ţesuturile şi fluidele din organism, sînt acizi de tărie slabă sau mijlocie. Aceştia împreună cu constantele lor de aciditate, exprimate prin ambele moduri (K_a şi pK_a), figurează în tabelul II.7.

3.4. HIDROLIZA SĂRURILOR

Diverse şi numeroase săruri „neutre" — deci ale căror molecule nu cuprind grupe HO^- sau atomi de H ionizabili — dau totuşi soluţii cu reacţie bazică sau acidă cînd sînt dizolvate în apă. Acest fapt se datoreşte *hidrolizei* sărurilor respective.

Prin hidroliza sărurilor se înţelege descompunerea parţială a lor în urma reacţiei cu apa a unora din ionii constitutivi. Fenomenul de hidroliză îl suferă, în special, sărurile acizilor slabi cu metalele alcaline (ex. acetatul de sodiu) şi sărurile bazelor slabe cu acizii tari (ex. clorura de amoniu).

Acetatul de sodiu este constituit de ioni acetici şi cationi de sodiu, pe care-i eliberează în soluţie, în momentul dizolvării:

$$CH_3-COONa \rightarrow CH_3-COO^- + Na^+$$

Dar ionul acetic este o bază anionică (slabă) care reacţionează protolitic cu apa:

$$CH_3-COO^- + HOH \rightleftharpoons CH_3-COOH + HO^-$$

iar ionul amoniu este un acid cationic (slab) care de asemenea reacţionează protolitic cu apa:

$$HN_4 + HOH \rightleftharpoons NH_3 + H_3O^+$$

Deci sărurile, de felul celor menţionate, hidrolizează datorită faptului că ele eliberează prin disociere fie o bază slabă, fie un acid slab (care reacţionează protolitic cu apa). Pentru sărurile care prin disociere eliberează o bază slabă, ca acetatul de sodiu, hidroliza lor constă într-o reacţie de tipul:

$$A^- + HOH \rightleftharpoons AH + HO^-,$$

bază slabă

Scanned with OKEN Scanner

reacţia soluţiei este alcalină. În mod analog, pentru toate sărurile care prin disociere eliberează un acid slab, hidroliza lor constă într-o reacţie protolitică de tipul:

$$\underset{\text{acid slab}}{BH^+} + HOH \rightleftharpoons B + H_3O^+$$

reacţia soluţiei este acidă.

Sărurile care prin disociere eliberează simultan un acid slab şi o bază slabă (cianura de amoniu), hidrolizează conform reacţiilor precedente. Însă în aceste cazuri mai are loc şi reacţia:

$$HO^- + H_3O^+ \rightleftharpoons 2\,HOH$$

Caracterul acid sau bazic al soluţiei unei asemenea sări depinde de constantele de aciditate şi de bazicitate ale componentelor: soluţia are reacţie acidă cînd acidul are $K_a > K_b$ a bazei şi invers, reacţia soluţiei este alcalină cînd $K_b > K_a$.

Sărurile rezultate din neutralizarea acizilor tari cu bazele tari (NaCl, KNO_3) nu hidrolizează deoarece cationii (Na^+, K^+) nu sînt acizi sau baze iar anionii (Cl^-, NO_3^-) provin din acizi tari deci nu reacţionează protolitic în măsură apreciabilă cu apa (ca baze).

Hidroliza este un fenomen ce se petrece numai parţial; conduce la descompunerea numai a unei fracţiuni din sarea dizolvată. În reacţiile protolitice corespunzătoare, echilibrul este deplasat mult în favoarea reactanţilor. Hidroliza sărurilor este un fenomen total reversibil în sensul că dacă se evaporă apa din soluţie se recapătă sarea cum era înainte de dizolvare.

3.5. PROCESE BIOCHIMICE FUNDAMENTALE PRIN CARE SE GENEREAZĂ ACIZI ŞI BAZE ÎN ORGANISM

Majoritatea proceselor metabolice din organism generează direct sau indirect cantităţi apreciabile de ioni H^+, ceea ce face ca ele să fie considerate — în ansamblu — drept procese producătoare de acizi. Dintre acestea fac parte, în primul rînd, căile catabolice fundamentale ale principiilor imediate (glucide, lipide, proteine). Astfel:

a) Glicoliza, calea iniţială de degradare a glucozei din metabolismul glucidic, conduce la formarea de acid piruvic sau de acid lactic. Fiecare moleculă de glucoză (cu 6C) conduce la cîte două molecule de acid piruvic sau lactic şi fiecare din aceşti acizi liberează prin disocierea carboxilului lor ioni de hidrogen:

$$C_6H_{12}O_6 \rightarrow 2\,CH_3-\underset{\underset{\downarrow}{O}}{\overset{\|}{C}}-COOH \rightarrow 2\,CH_3-\underset{\underset{\downarrow}{OH}}{\overset{\overset{\downarrow}{H}}{\overset{|}{C}}}-COOH$$

$$2H^+ \qquad\qquad 2\,H^+$$

Mai mult decît atît, dacă degradarea glucozei este continuată pe cale aerobă (prin antrenarea acidului piruvic la decarboxilare oxidativă şi apoi în ciclul Krebs) are loc o producere suplimentară de protoni, provenind din acidul

Scanned with OKEN Scanner

carbonic format în cantitate apreciabilă pe seama decarboxilărilor care au loc în cursul acestor procese. Global, se poate scrie:

$$2\,CH_3-\underset{\underset{O}{\|}}{C}-COO^- + 5\,O_2 \rightarrow 4\,CO_2 + 2\,HCO_3^- + 2\,H_2O$$

$$CO_2 + H_2O \rightleftharpoons H_2CO_3 \rightarrow H^+ + HCO_3^-$$

b) In metabolismul lipidelor, degradarea trigliceridelor are ca rezultat — încă de la prima etapă de desfacere hidrolitică a acestora — eliberarea acizilor graşi constitutivi. Ulterior, degradarea β-oxidativă a acizilor graşi duce la formarea corpilor cetonici (acidul β-hidroxibutiric şi acidul acetoacetic) precum şi la cantităţi apreciabile de bioxid de carbon care — ca şi în cazul precedent — generează ioni H^+ din acidul carbonic corespunzător.

Schematic, se poate arăta producerea de H^+ din lipide astfel:

$$\text{Trigliceride} \xrightarrow{HOH} \begin{cases} \text{glicerină} \\ \text{acizi graşi} \rightarrow \beta\text{-oxidare} \rightarrow \text{corpi cetonici} \\ \downarrow \\ H^+ \end{cases} \quad \begin{matrix} \text{acizi} \\ \downarrow \\ H^+ + CO_2 \end{matrix}$$

$$CO_2 + H_2O \rightleftharpoons H_2CO_3 \rightarrow H^+ + HCO_3^-$$

c) În cazul metabolismului proteic, formarea ureei — ultimul catabolit al proteinelor în organismul omului — este un proces generator de acizi:

$$2\,NH_4^+ + HCO_3^- \rightarrow H_2N-\underset{\underset{O}{\|}}{C}-NH_2 + 2\,H_2O + H^+$$

De asemenea, degradarea oxidativă a aminoacizilor, proveniţi din proteine, este şi ea generatoare de acizi. Spre exemplu, din degradarea oxidativă a metioninei se eliberează — în final — cantităţi apreciabile de protoni. Global, se poate scrie:

$$2\,H_3C-S-CH_2-CH_2-\underset{\underset{NH_2}{|}}{CH}-COOH + 15\,O_2 \rightarrow$$

$$H_2N-\underset{\underset{O}{\|}}{C}-NH_2 + 2\,H_2SO_4 + 9\,CO_2 + 7\,H_2O$$

$$\begin{matrix} \downarrow \\ 1\,H^+ \end{matrix} \qquad \begin{matrix} \downarrow \\ 4\,H^+ \end{matrix} \qquad \begin{matrix} 9\,H_2CO_3 \\ \downarrow \\ 9\,H^+ \end{matrix}$$

Hrana, datorită unor componenţi alimentari, reprezintă şi ea o sursă de ioni H^+ în organism. Spre exemplu, fosforul din alimente — în urma degradărilor hidrolitice şi oxidative din organism — este transformat în acid fosforic (sau anionul $H_2PO_4^-$ care disociază ca acid). Astfel, prin oxidarea completă a fosfolipidului complex numit lecitină rezultă cantităţi considerabile de protoni. Reacţia globală este:

$$2\,C_{43}H_{88}O_9NP + 122\,O_2 \rightarrow H_2N-\underset{\underset{O}{\|}}{C}-NH_2 + 2\,H_3PO_4 + 85\,CO_2 + 83\,H_2O$$

$$\begin{matrix} \downarrow \\ 1\,H^+ \end{matrix} \qquad \begin{matrix} \downarrow \\ 6\,H^+ \end{matrix} \qquad \begin{matrix} \downarrow \\ 85\,H^+ \end{matrix}$$

Scanned with OKEN Scanner

Deşi obţinerea de baze în organism are loc în mai mică măsură, produsul final de oxidare în majoritatea degradărilor este baza anionică, HCO_3^-, care se formează în cantităţi apreciabile.

Pe de altă parte, majoritatea alimentelor vegetale din hrană sînt considerate surse alcalinizante, tocmai pentru că în urma degradărilor generează baze anionice de felul bicarbonatului.

Ţinînd seama de cele menţionate aici, se înţelege că organismul este confruntat, în permanenţă, cu numeroase tendinţe acidifiante şi alcalinizante care-i ameninţă păstrarea constantă a pH-ului mediului intern. Împotriva acestor tendinţe organismul „se apără" prin utilizarea sistemelor tampon şi prin alte mecanisme fiziologice.

4. SISTEMELE TAMPON

Sistemele tampon sînt amestecuri, în soluţie, de două sau mai multe substanţe chimice, anorganice sau organice. Există două tipuri principale de sisteme tampon:

— cele de tipul ANa+AH, constituite de sarea de sodiu sau de potasiu a unui acid slab (NaA) şi de acidul slab corespunzător (AH);

— cele de tipul B.HCl+B, constituite de o sare a unui acid tare cu o bază slabă (B.HCl) şi de această bază slabă (B).

Exemple de sisteme tampon de tipul ANa+AH:

$$\begin{cases} CH_3-COOH \\ CH_3-COONa \end{cases} \quad \begin{cases} H_2CO_3 \\ HNaCO_3 \end{cases} \quad \begin{cases} H_2NaPO_4 \\ HNa_2PO_4 \end{cases}$$

Exemplu de sistem tampon de tipul BHCl+B:

$$\begin{cases} NH_4Cl \\ NH_3 \end{cases}$$

Din exemplele date se constată că sărurile din constituţia sistemelor tampon sînt săruri hidrolizabile.

4.1. MECANISMUL ACŢIUNII SISTEMELOR TAMPON

a) *Cazul sistemelor de tipul ANa+AH.* Sarea ANa se află complet disociată:

$$ANa \rightarrow A^- + Na^+$$

Deci în soluţie se află în cantitate mare baza anionică, A^-. Acidul AH se află în parte ionizat în urma reacţiei protolitice cu apa:

$$AH + HOH \rightleftharpoons A^- + H_3O^+$$

În ultima reacţie, echilibrul este mult deplasat spre reactanţi deoarece acidul este slab şi în soluţie se află mulţi ioni A^- proveniţi din sare, comuni cu cei proveniţi din acid. De aceea, acidul AH se află practic sub formă neionizată. Se poate spune, în acest caz, că amestecul tampon este constituit de acidul slab (neionizat) şi de baza lui conjugată. Aceste componente iau parte la tamponarea acizilor şi bazelor. Într-adevăr:

— cînd în sistem se introduce un acid, componenta bazică, A^-, acceptă protonii şi trece în acidul conjugat neionizat:

$$A^- + H^+ \rightarrow AH$$

Scanned with OKEN Scanner

— cînd în sistem se introduce o bază (deci HO^-), componenta acidă, AH, liberează protoni neutralizînd ionii HO^- şi se transformă în baza sa conjugată:

$$AH + HO^- \rightarrow H_2O + A^-.$$

Spre exemplu, în sistemul biocarbonatului au loc reacţiile:

a) $CO_3H^- + H^+ \rightarrow H_2CO_3$

b) $H_2CO_3 + HO^- \rightarrow H_2O + CO_3H^-$

În sistemul fosfaţilor ambele componente sînt săruri complet disociate:

$$HK_2PO_4 \rightarrow HPO_4^{2-} + 2\,K^+$$

$$H_2KPO_4 \rightarrow H_2PO_4^- + K^+$$

Componenta acidă este anionul fosforic $H_2PO_4^-$ (practic neionizat):

$$H_2PO_4^- + HOH \rightarrow HPO_4^{2-} + H_3O^+$$

iar componenta bazică este HPO_4^{-2} (baza lui conjugată). Deci componentele efective ale sistemului sînt: $H_2PO_4^-$ şi HPO_4^{2-}. În timpul tamponării componentele funcţionează astfel:

$$H_2PO_4^- + HO^- \rightarrow H_2O + HPO_4^{2-}$$

$$HPO_4^{2-} + H^+ \rightarrow H_2PO_4^-$$

b) *Cazul sistemelor de tipul BHCl+B.* Sarea BHCl se află complet disociată:

$$BHCl \rightarrow BH^+ + Cl^-$$

deci în soluţie se află o cantitate mare de acid cationic BH^+. Baza B se află în parte ionizată în urma reacţiei:

$$B + HOH \rightarrow BH^+ + HO^-$$

dar echilibrul este mult deplasat în favoarea reactanţilor din cauza cantităţii mari de ioni comuni BH^+. Aşadar, componentele efective ale sistemului tampon sînt: baza B şi acidul său conjugat BH^+.

Baza tamponează acizii în reacţii de felul:

$$B + H^+ \rightarrow BH^+$$

Acidul cationic, BH^+, tamponează bazele în reacţii de felul:

$$BH^+ + HO^- \rightarrow B + H_2O.$$

Spre exemplu, în sistemul tampon constituit de clorură de amoniu şi amoniac au loc reacţiile:

$$NH_3 + H^+ \rightarrow NH_4^+$$

$$NH_4^+ + HO^- \rightarrow NH_3 + HOH$$

4.2. PROPRIETĂŢILE SISTEMELOR TAMPON

Prin exercitarea efectului tampon sistemele tampon împiedică variaţiile pH-ului propriei lor soluţii. Acest pH poate fi determinat prin diverse metode; însă el poate fi stabilit — a priori — cu ajutorul unei ecuaţii matematice,

Scanned with OKEN Scanner

în funcţie de natura substanţelor care intră în constituţia sistemului şi în funcţie de concentraţiile lor. Ecuaţia cu ajutorul căreia se poate calcula concentraţia ionilor de hidrogen dintr-un sistem tampon (pH-ul lui) se numeşte ecuaţia Henderson-Hasselbalch. Pentru un sistem tampon format dintr-un acid slab şi o sare hidrolizabilă a lui, relaţia Henderson-Hasselbalch are forma:

$$(1)\ [H^+]=K_a \cdot \frac{C_{acid}}{C_{sare}}$$

Spre exemplu, pentru sistemul tampon constituit de acid acetic şi acetat de sodiu, ecuaţia Henderson-Hasselbalch este:

$$[H^+]=1{,}8\times10^{-5}\,\frac{C_{acid}}{C_{sare}}$$

Logaritmînd şi introducînd notaţiile, „pondus" se obţine:

$$(2)\ pH=pK_a+\log\frac{C_{sare}}{C_{acid}}$$

Pentru sistemele tampon de felul celui constituit de amoniac şi clorură de amoniu, deci dintr-o bază slabă şi o sare hidrolizabilă a sa, relaţia Henderson-Hasselbalch devine:

$$(3)\ [H^+]=K_a \cdot \frac{C_{sare}}{C_{bază}}$$

sau, logaritmînd:

$$(4)\ pH=pK_a+\log\frac{C_{bază}}{C_{sare}}$$

Ambele formulări (2) şi (4) ale ecuaţiei Henderson-Hasselbalch pot fi confundate într-una singură, aplicabilă tuturor tipurilor de sisteme tampon:

$$pH=pK_a+\log\frac{[\text{acceptor de protoni}]}{[\text{donor de protoni}]}$$

Ultima formulare (ca de altfel şi celelalte) permite calcularea pH-ului unui sistem tampon cînd se cunoaşte valoarea constantei K_a şi concentraţiile componentelor sistemului. În egală măsură, expresia permite calcularea raportului dintre concentraţiile componentelor cînd se cunoaşte valoarea K_a şi pH-ul mediului. Determinarea acestui raport este foarte utilă pentru aprecierea modificării concentraţiilor componentelor ca urmare a unor defecte metabolice; spre exemplu, modificarea concentraţiei acidului β-hidroxibutiric în diabet şi a concentraţiei acidului cationic NH_4^+ în cazurile de incapacitate a ficatului pentru utilizarea acestui cation la biosinteza ureei. Într-adevăr, înlocuind în ecuaţia Henderson-Hasselbalch valoarea pH a sîngelui egală cu 7,40 şi pK_a a sistemului tampon constituit din acid β-hidroxibutiric şi β-hidroxibutirat cu valoarea sa 4,39, se obţine pentru raportul concentraţiilor valoarea 1 000 : 1. Prin urmare, în acest caz, concentraţia acidului β-hidroxibutiric este de 1 000 ori mai mică decît a β-hidroxibutiratului. În schimb, în cazul sistemului tampon constituit din NH_4^+ şi NH_3, înlocuindu-se pH-ul sîngelui cu valoarea 7,40 şi pK_a cu 9,21, se obţine pentru raportul concentraţiilor, aproximativ, valoarea 1 : 100. Deci, în acest caz, concentraţia acidului cationic NH_4^+ este de 100 ori mai mare decît a amoniacului.

Scanned with OKEN Scanner

Proprietățile sistemului tampon rezultă imediat tot din examinarea ultimei formulări a ecuației Henderson-Hasselbalch. După cum este ușor de înțeles, ele depind atît de valoarea constantei K_a cît și de valoarea raportului concentrațiilor celor două componente din sistem.

a) *Dependența de constanta de aciditate* K_a. Cînd într-un sistem tampon concentrația componentelor sistemului (C_{acid} și C_{sare}) sînt egale, concentrația ionilor H^+ devine egală cu constanta de aciditate a componentei acide din sistem. Astfel, un amestec echimolar de acid acetic și acetat de sodiu, în soluție, are o concentrație în ioni H^+ egală cu K_a a acidului acetic $=1,8 \times 10^{-5}$ (sau pH $=4,73$).

Cînd în diverse sisteme tampon concentrațiile fiecărei perechi de componente sînt egale, sistemele în care K_a este mai mare (deci componenta acidă este un acid mai tare) au un pH mai mic decît cele în care componenta acidă are o constantă de aciditate mai mică. Spre exemplu, dintre următoarele amestecuri echimoleculare în soluție: (1) acid acetic și acetat de sodiu, (2) acid carbonic și bicarbonat de sodiu și (3) fosfat monosodic și fosfat disodic, primul sistem tampon este cel mai acid (pH $=4,73$), al doilea este mai puțin acid (pH $=6,5$) deoarece $K_{aH_2CO_3} = 3,47 \times 10^{-7}$ iar al treilea este cel mai puțin acid (pH $=6,8$) căci $K_{aH_2PO_4^-} = 1,2 \times 10^{-7}$.

b) *Dependența de raportul concentrațiilor componentelor*. Aceasta reiese din luarea în considerație a sistemelor în care concentrațiile componentelor sistemului nu sînt egale:

— Cu cît concentrația componentei acide (donorul de protoni) este mai mare, cu atît reacția sistemului tampon este mai acidă iar cu cît concentrația componentei bazice (acceptorul de protoni) este mai mare, cu atît reacția sistemului este mai alcalină. Aceasta înseamnă că se pot prepara, cu aceleași componente, mai multe sisteme tampon variindu-se numai concentrațiile componentelor.

— Deoarece, așa cum reiese din expresia ecuației Henderson-Hasselbalch, reacția unui sistem tampon nu depinde de valoarea absolută a concentrațiilor componenților lui ci de raportul concentrațiilor, se înțelege că prin diluarea cu apă reacția sistemului nu se schimbă (deci pH-ul se menține constant). Bineînțeles, diluarea nu trebuie să fie prea înaintată căci în asemenea caz se promovează protoliza componentei acide în așa măsură încît fenomenul nu mai poate fi neglijat (cum s-a presupus cînd s-a stabilit ecuația Henderson-Hasselbalch, acidul fiind socotit practic neionizat).

— În procesul tamponării proporția concentrațiilor componentelor sistemului se schimbă, ceea ce înseamnă că și pH-ul se schimbă. Deci tamponarea nu constă într-o înlăturare completă a efectului ionilor H^+ sau OH^- ci numai din înlăturarea parțială a acestui efect. Așadar, în urma adaosului de acid sau de bază pH-ul soluției tampon se modifică foarte puțin în raport cu cantitatea de acid sau de bază adăugată. Spre exemplu, dacă în soluția unui amestec tampon cuprinzînd acid acetic și acetat de sodiu în concentrații molare se introduce 0,5 echivalent de acid tare, concentrațiile componenților se modifică în modul următor: concentrația sării scade de la 1 la 0,5 căci sarea se consumă în timpul reacției de tamponare ($A^- + H^+ \rightarrow AH$) iar concentrația acidului crește în aceeași măsură: de la 1 la 1,5. Înlocuind valorile acestor concentrații modificate în expresia ecuației Henderson-Hasselbalch se obține:

$$pH = 4,73 \log \frac{0,5}{1,5} = 4,73 + \log 0,33 = 4,25$$

Scanned with OKEN Scanner

Prin urmare, după adăugarea acidului (0,5 echiv. acid tare), pH-ul inițial al sistemului scade numai de la 4,73 la 4,25.

Bineînțeles, cantitatea de acid sau de bază care se adaugă nu trebuie să fie prea mare căci atunci capacitatea tampon a sistemului este depășită.

Capacitatea tampon a unui sistem tampon se exprimă în unități definite astfel: un sistem tampon are capacitatea tampon unitară (1) cînd la 1 000 ml soluție tampon trebuie să se adauge un echivalent de acid tare sau de bază tare pentru ca pH-ul sistemului să se schimbe cu o unitate. Prin urmare, dimensiunea capacității tampon este: nEchiv./litru/pH.

Un sistem tampon este cu atît mai eficace cu cît concentrația lui globală (suma concentrațiilor componentelor) este mai mare, căci consumul lor în timpul tamponării nu este apreciabil; pe de altă parte, eficacitatea unui sistem tampon este cu atît mai mare cu cît raportul dintre concentrațiile componentelor lui este mai apropiat de 1 (deci mai apropiate) căci consumul lor în timpul tamponării le îndepărtează mai puțin.

Într-adevăr, considerînd două sisteme tampon constituite de acid carbonic și bicarbonat: unul cuprinzînd cîte 1 mol din fiecare component iar celălalt cîte 5 moli, la adăugarea a cîte 0,1 moli bază, pH-ul inițial (=6,1) al sistemelor tampon se modifică astfel:

$$(1)\ pH = 6{,}1 + \log \frac{1{,}1}{0{,}9} = 6{,}1 + 0{,}08715 = 6{,}18715$$

$$(2)\ pH = 6{,}1 + \log \frac{5{,}1}{4{,}9} = 6{,}1 + 0{,}01737 = 6{,}11737.$$

Se înțelege — în aceste condiții — că un sistem tampon cuprinzînd 5 M componentă acidă și 5 M componentă bazică poate să tamponeze o cantitate de ioni HO^- și H^+ de 5 ori mai mare decît un sistem tampon constituit numai din 1 M componentă acidă și 1 M componentă bazică. Într-adevăr, log raportului dintre concentrația componentei bazice și concentrația componentei acide, 0,01737, este de cca 5 ori mai mic în relația (2) decît log aceluiași raport, 0,08715, din relația (1).

4.3. SISTEMELE TAMPON DIN ORGANISM

Unele sisteme tampon din organism sînt constituite numai din substanțe anorganice iar altele din substanțe organice (mai mult sau mai puțin complexe). În ordinea complexității lor crescînde, principalele sisteme tampon din organism sînt: (1) sistemul tampon acid carbonic — bicarbonat, (2) sistemul tampon al fosfaților, (3) sistemul tampon ale unor acizi organici și (4) sistemul tampon al hemoglobinei.

1) Sistemul tampon constituit de acid carbonic și bicarbonat de sodiu se află în toate fluidele organismului. Acest sistem cuprinde exces de componentă bazică (bicarbonat). Într-adevăr, concentrația bicarbonatului de sodiu din sînge este de 20 de ori mai mare decît cea a acidului carbonic. Datorită acestui fapt, sistemul tamponează eficient acizii realizînd păstrarea constantă a pH-ului mediului intern (sîngelui). Pe de altă parte, datorită instabilității sale, acidul carbonic se află în soluție atît hidratat cît și nehidratat, ambele forme fiind în echilibru:

$$(a)\ CO_2 + H_2O \rightleftharpoons H_2CO_3$$

Scanned with OKEN Scanner

iar forma hidratată este parţial ionizată:

$$(b)\ H_2CO_3 + HOH \rightleftharpoons HCO_3^- + H_3O^+$$

Deoarece bioxidul de carbon (gazos) prin hidratare poate forma acid carbonic [reacţia (a)] şi aceasta poate ioniza mai departe [reacţia (b)], el trebuie considerat sursă potenţială de acid carbonic şi de aceea trebuie înglobat în componenta acidă a sistemului (alături de H_2CO_3). Deci cele două componente ale sistemului sînt: HCO_3^- (componentă bazică) şi $H_2CO_3 + CO_2$ (componenta acidă).

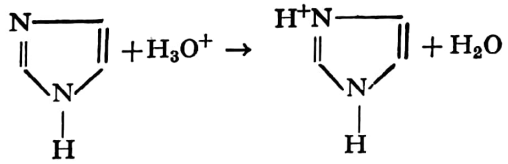
2) Sistemul tampon al fosfaţilor se află atît în celule cît şi în spaţiul extracelular. Eficienţa lui este mare; în special, în celule unde concentraţiile KH_2PO_4 şi K_2HPO_4 sînt de asemenea mari. În spaţiul extracelular componenţii sistemului sînt fosfaţii de sodiu (NaH_2PO_4 şi Na_2HPO_4), corespunzători celor de potasiu, intracelulari. Sistemul tampon al fosfaţilor din compartimentul extracelular este mai puţin eficient decît cel constituit din acid carbonic şi bicarbonat.

Trebuie reţinut însă că în salivă ambele sisteme tampon (acid carbonic — bicarbonat de sodiu şi fosfat monosodic — fosfat disodic) sînt deosebit de eficiente pentru menţinerea constantă a pH-ului salivar.

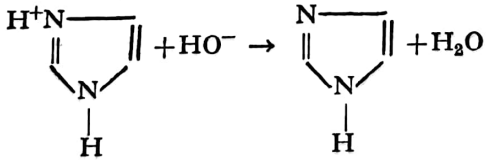
3) Sistemele tampon ale unor acizi organici sînt constituite, în special, din: acid lactic şi lactat alcalin, acid piruvic şi piruvat alcalin, acid acetoacetic şi o sare a sa alcalină.

4) Sistemul tampon al hemoglobinei. Hemoglobina îşi poate exercita acţiunea tampon în special, datorită faptului că cuprinde — în partea sa proteică — multe resturi de histidină. Acesta este un aminoacid cu nucleu imidazolic care, avînd capacitatea să accepte şi să cedeze H^+ la un atom de azot din heterociclul său, poate funcţiona ca bază sau ca acid.

Imidazolul — sub formă de bază liberă — neutralizează acizii:



Imidazolul — cu nucleu protonat — neutralizează bazele:



Hemoglobina intră în constituţia a două sisteme tampon: (a) hemoglobină acidă — hemoglobinat de potasiu şi (b) oxihemoglobină — oxihemoglobinat de potasiu. Atît sistemul care cuprinde hemoglobina cît şi cel care cuprinde hemoglobina oxidată (oxihemoglobina) reprezintă cele mai importante sisteme tampon cu componente proteice din sînge.

4.4. UTILIZAREA SISTEMELOR TAMPON PENTRU DETERMINAREA pH-ului UNEI SOLUŢII

Pentru determinarea pH-ului unei soluţii în laboratoarele de biochimie se practică în mod curent metoda colorimetrică. Aceasta utilizează sistemele tampon şi indicatorii de neutralizare.

Scanned with OKEN Scanner

4.4.1. INDICATORII DE NEUTRALIZARE

Aceştia sînt, în genere, acizi slabi sau baze slabe organice a căror forme ionizate (bază anionică sau acid cationic) au culori diferite de culorile moleculelor neionizate. Spre exemplu, roşu de metil este un acid slab ale cărui molecule neionizate colorează soluţiile în roşu, pe cînd ionii pe care-i pune în libertate, în urma reacţiei protolitice:

$$\underset{\text{roşu}}{AH} + HOH \rightleftharpoons \underset{\text{galben}}{A^-} + H_3O^+$$

le colorează în galben.

Fiind acizi sau baze slabe care reacţionează protolitic cu apa, indicatorii sînt caracterizaţi de K_a respectiv, de K_b. Un indicator acid are o constantă de aciditate dată de:

$$K_{a\ ind.} = \frac{[A^-][H_3O^+]}{[AH]}$$

Această ecuaţie poate fi pusă sub forma următoare:

$$\frac{[AH]}{[A^-]} = \frac{1}{K_{a\ ind.}}[H_3O^+] \quad \text{sau} \quad \frac{[AH]}{[A^-]} = \frac{1}{K_{a\ ind.}} \times [H^+].$$

Pentru ca să se înţeleagă semnificaţia acestei formule, trebuie să se reţină că indicatorii sînt adăugaţi soluţiilor pe care le colorează în cantităţi aşa de mici încît ei nu pot influenţa cîtuşi de puţin concentraţia ionilor de hidrogen din soluţii. Toţi ionii H_3O^+ (sau H^+) rezultaţi din reacţia protolitică a indicatorului acid cu apa sînt neutralizaţi într-o soluţie alcalină de ioni HO^- din soluţie fără ca concentraţia acestora din urmă să fie modificată apreciabil. De asemenea, toţi ionii HO^- rezultaţi din reacţia protolitică cu apa a unui indicator bazic se combină în totalitate cu ioni H^+ dintr-o soluţie acidă fără ca aciditatea soluţiei să se schimbe. În aceste condiţii, ultima din formulele de mai sus arată că raportul dintre forma neionizată şi cea ionizată a unui indicator dintr-o soluţie este determinată de pH-ul soluţiei.

Tabelul II.?

Intervalele de viraj şi culorile extreme ale cîtorva indicatori de neutralizare

Numele indicatorului	Intervalul de viraj	Culori extreme
Tropeolină OO	1,3 — 3,2	roşu — galben
Albastru de brom-fenol	3,0 — 4,6	galben — purpur
Roşu de metil	4,4 — 6,2	roşu — galben
Albastru de brom-timol	6,2 — 7,6	galben — albastru
Roşu de crezol	7,2 — 8,6	galben — roşu
Fenolftaleină	8,0 — 10,0	incolor — roşu
Timolftaleină	9,4 — 10,6	incolor — albastru
Galben de alizarină	10,0 — 12,0	galben — violet
Tropeolină O	11,0 — 13,0	galben — orange

Culoarea pe care un indicator o imprimă unei soluţii depinde, bineînţeles, de măsura în care el este ionizat (tabelul II.8).

Roşul de metil colorează în roşu toate soluţiile cu pH-uri mai mici decît 4,4. Pe de altă parte, el colorează în galben toate soluţiile cu pH-uri mai

Scanned with OKEN Scanner

mari decît 6,2. În fine, soluţiile cu pH-uri intermediare sînt colorate în „culori amestecate": ele iau nuanţe intermediare între roşu şi galben, nuanţe care variază continuu în acest interval cu pH-ul soluţiilor. Se spune de aceea că între pH 4,4 şi pH 6,2 indicatorul (de fapt, culoarea lui) *virează* iar intervalul de pH 4,4—6,2 este *intervalul de viraj* al indicatorului. Există însă o serie de indicatori cu intervale de viraj care acoperă toată scara pH-urilor de la 1 la 13. În acest mod, cu ajutorul indicatorilor menţionaţi — a unuia sau altuia dintre ei — se pot determina toate pH-urile cuprinse în intervalul de pH 1—13. Măsurarea pH-urilor prin utilizarea indicatorilor constituie metoda colorimetrică.

4.4.2. METODA COLORIMETRICĂ

Această metodă constă în evaluarea culorii pe care un indicator, ales în mod potrivit, o impune soluţiei al cărui pH trebuie determinat. Evaluarea se face prin comparaţie: acelaşi indicator este adăugat în aceeaşi concentraţie soluţiei de cercetat şi unei serii de soluţii cu pH-uri cunoscute. Se stabileşte apoi care dintre soluţiile cu pH-uri cunoscute are aceeaşi culoare ca soluţia necunoscută (bineînţeles, aceste două soluţii au pH-uri egale). Într-adevăr, culorile identice ale indicatorului dau seama de ionizare în egală măsură a lui, iar ionizarea este corespunzătoare concentraţiilor egale de ioni H^+ deci valorilor egale de pH. Soluţiile de comparaţie sînt soluţii tampon în care proporţia acid/sare variază, astfel încît pH-urile acestor tampoane să acopere intervalul de viraj al indicatorului. Determinarea propriu-zisă a pH-ului este precedată de încercări preliminarii prin care se stabileşte ce indicator şi ce serie de soluţii tampon sînt potrivite pentru cercetarea soluţiei care interesează.

Scanned with OKEN Scanner

PROTEINELE

Proteinele reprezintă — după apă — constituenţii cei mai importanţi ai organismelor vegetale şi animale. În aceste organisme proteinele împlinesc roluri multiple şi variate: intră în structura celulelor din diverse organe şi ţesuturi, sînt constituenţii principali ai enzimelor, sînt hormoni ce intervin în reglarea proceselor metabolice.

Indiferent de originea lor, de specia de la care provin, proteinele sînt constituite dintr-un număr mare de aminoacizi deosebiţi structural unii de alţii, ceea ce conferă proteinelor o complexitate şi o varietate extraordinară. Moleculele tuturor proteinelor „se constituiesc" cu ajutorul unui grup de 20 α-aminoacizi. Unirea α-aminoacizilor se face prin eliminare de apă între gruparea —COOH a unui aminoacid şi gruparea $-NH_2$ a aminoacidului vecin, realizîndu-se astfel legături peptidice:

$$H_2N-CHR_1-CO-NH-CHR_2-CO-NH-CHR_3-CO\cdots NH-CHR_n-COOH$$

Aminoacizii constitutivi se liberează prin hidroliza completă a proteinelor.

Deoarece numeroase proprietăţi ale proteinelor se datoresc faptului că sînt constituite din aminoacizi, este necesar să se prezinte — în prealabil — aminoacizii care intră în compoziţia lor, şi proprietăţile acestor α-aminoacizi.

1. AMINOACIZII

1.1. CLASIFICAREA α-AMINOACIZILOR DIN CONSTITUŢIA PROTEINELOR

Există mai multe criterii de clasificare a acestor aminoacizi: (1) natura radicalului hidrocarbonat (alifatic, aromatic, heterociclic), (2) numărul grupărilor carboxilice şi amino din moleculă, (3) prezenţa în molecule (în cuprinsul radicalului) a altor grupări funcţionale (—OH, —SH).

Ţinîndu-se seama de faptul că radicalul hidrocarbonat poate să cuprindă sau nu alte grupări funcţionale precum şi de faptul că atunci cînd cuprind asemenea grupări, în funcţie de natura lor, radicalul ajunge să aibă o anume sarcină electrică (polaritate), cei 20 α-aminoacizi se clasifică şi în funcţie de polaritatea radicalului. Conform acestui ultim criteriu de clasificare (al 4-lea), α-aminoacizii din constituţia proteinelor se împart în 4 grupe: (a) cu radical

Scanned with OKEN Scanner

PROTEINELE

Proteinele reprezintă — după apă — constituenţii cei mai importanţi ai organismelor vegetale şi animale. În aceste organisme proteinele împlinesc roluri multiple şi variate: intră în structura celulelor din diverse organe şi ţesuturi, sînt constituenţii principali ai enzimelor, sînt hormoni ce intervin în reglarea proceselor metabolice.

Indiferent de originea lor, de specia de la care provin, proteinele sînt constituite dintr-un număr mare de aminoacizi deosebiţi structural unii de alţii, ceea ce conferă proteinelor o complexitate şi o varietate extraordinară. Moleculele tuturor proteinelor „se constituiesc" cu ajutorul unui grup de 20 α-aminoacizi. Unirea α-aminoacizilor se face prin eliminare de apă între gruparea —COOH a unui aminoacid şi gruparea $-NH_2$ a aminoacidului vecin, realizîndu-se astfel legături peptidice:

$$H_2N-CHR_1-CO-NH-CHR_2-CO-NH-CHR_3-CO\cdots NH-CHR_n-COOH$$

Aminoacizii constitutivi se liberează prin hidroliza completă a proteinelor.

Deoarece numeroase proprietăţi ale proteinelor se datoresc faptului că sînt constituite din aminoacizi, este necesar să se prezinte — în prealabil — aminoacizii care intră în compoziţia lor, şi proprietăţile acestor α-aminoacizi.

1. AMINOACIZII

1.1. CLASIFICAREA α-AMINOACIZILOR DIN CONSTITUŢIA PROTEINELOR

Există mai multe criterii de clasificare a acestor aminoacizi: (1) natura radicalului hidrocarbonat (alifatic, aromatic, heterociclic), (2) numărul grupărilor carboxilice şi amino din moleculă, (3) prezenţa în molecule (în cuprinsul radicalului) a altor grupări funcţionale (—OH, —SH).

Ţinîndu-se seama de faptul că radicalul hidrocarbonat poate să cuprindă sau nu alte grupări funcţionale precum şi de faptul că atunci cînd cuprind asemenea grupări, în funcţie de natura lor, radicalul ajunge să aibă o anume sarcină electrică (polaritate), cei 20 α-aminoacizi se clasifică şi în funcţie de polaritatea radicalului. Conform acestui ultim criteriu de clasificare (al 4-lea), α-aminoacizii din constituţia proteinelor se împart în 4 grupe: (a) cu radical

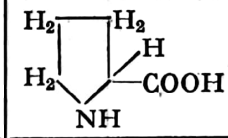
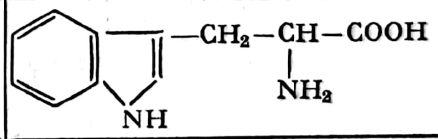
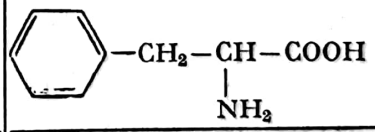
Scanned with OKEN Scanner

apolar (hidrofob), (b) cu radical polar dar neîncărcat la pH-ul fiziologic (pH ≃ 7); (c) cu radical polar încărcat negativ sau (d) pozitiv la pH-ul fiziologic.

Numele, simbolurile și structurile aminoacizilor din fiecare grup sînt prezentate în tabelul III.1.

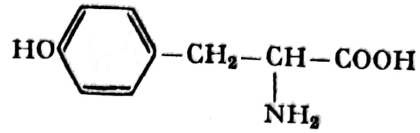
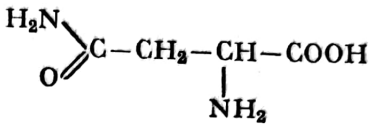
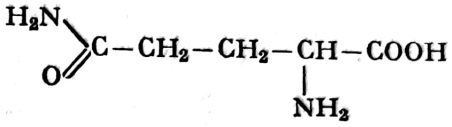
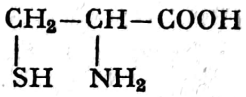
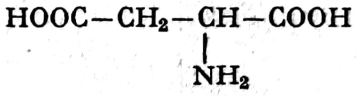
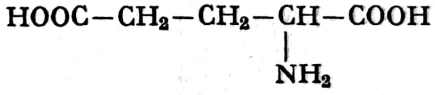
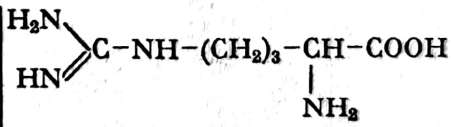
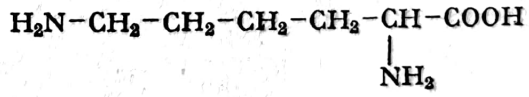
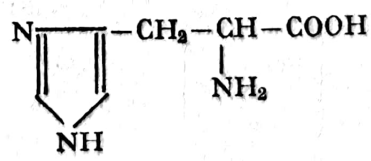
Tabelul III.1

α-aminoacizii din structura proteinelor

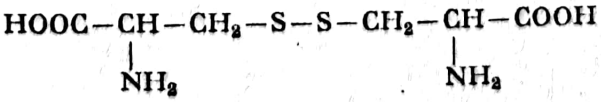
Grupa	Numele obișnuit	Simbolul	Numele chimic	Formula structurală
a) *cu radical apolar (hidrofob)*				
	Alanina	Ala	α-aminopropionic	$CH_3-CH(NH_2)-COOH$
	Valina	Val	α-aminoizovalerianic	$(CH_3)_2CH-CH(NH_2)-COOH$
	Leucina	Leu	α-aminoizocaproic	$(CH_3)_2CH-CH_2-CH(NH_2)-COOH$
	Izoleucina	Ile	α-amino-β-metil-valerianic	$CH_3-CH_2-CH(CH_3)-CH(NH_2)-COOH$
	Prolina	Pro	α-pirolidincarbonic	
	Triptofanul	Trp	α-amino-β-indolil-propionic	
	Fenilalanina	Phe	α-amino-β-fenil-propionic	
	Metionina	Met	α-amino-γ-metil-tio-butiric	$CH_2(SCH_3)-CH_2-CH(NH_2)-COOH$
b) *cu radical polar neîncărcat la pH-ul fiziologic*				
	Glicocolul	Gly	aminoacetic	$CH_2(NH_2)-COOH$
	Serina	Ser	α-amino-β-hidroxi-propionic	$CH_2(OH)-CH(NH_2)-COOH$
	Treonina	Thr	α-amino-β-hidroxi-butiric	$CH_3-CH(OH)-CH(NH_2)-COOH$

Scanned with OKEN Scanner

Tabelul III.1 (continuare)

Grupa	Numele obișnuit	Simbolul	Numele chimic	Formula structurală
	Tirozina	Tyr	α-amino-β-(p-hidroxi-fenil-) propionic	
	Asparagina	Asn	γ-amida acidului α-amino-succinic	
	Glutamina	Gln	δ-amida acidului α-amino-glutaric	
	Cisteina	Cys	α-amino-β-tiopropionic	
c) cu radical polar încărcat negativ				
	Acidul aspartic	Asp	α-aminosuccinic	
	Acidul glutamic	Glu	α-aminoglutaric	
d) cu radical polar încărcat pozitiv				
	Arginina	Arg	α-amino-δ-guanidin-valerianic	
	Lizina	Lys	α, ε-diaminocaproic	
	Histidina	His	α-amino-β-imidazolil-propionic	

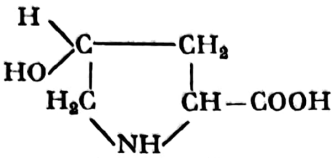
Este de menționat că adesea în structura proteinelor intră și aminoacidul numit cistină care se formează din două molecule de cisteină prin dehidrogenare:



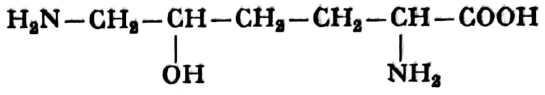
Cistina

Pe lîngă cei 20 α-aminoacizi care intră curent în constituţia proteinelor, se mai găsesc şi alţii care se află în cantitate mică numai în anumite tipuri de proteine specializate prin funcţiile ce le împlinesc. Fiecare din aceşti aminoacizi provine dintr-unul din cei 20 α-aminoacizi menţionaţi. Printre ei, mai importanţi sînt următorii:

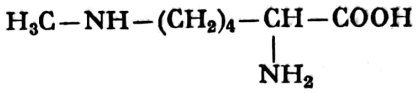
4-*hidroxiprolina* derivată din prolină, 5-*hidroxilizina* şi ε-*N-metil-lizina* provenite din lizină:



4-hidroxiprolina



5-hidroxilizina



ε-N-metil-lizina

4-hidroxiprolina şi 5-hidroxilizina intră în constituţia proteinei fibrilare colagen iar N-metil-lizina se găseşte în miozină, proteină musculară importantă.

1.2. PROPRIETĂŢILE FIZICE ALE AMINOACIZILOR

1.2.1. STAREA DE AGREGARE ŞI STABILITATEA

Aminoacizii sînt substanţe solide, albe, cristaline şi stabile la temperatura obişnuită. Se descompun însă relativ uşor la încălzire (200°—300°). Este de remarcat faptul că punctele de topire şi descompunere ale aminoacizilor nu sînt suficient de nete ca să poată fi folosite la recunoaşterea lor. Aminoacizii sînt substanţe stabile chiar şi cînd se încălzesc în soluţii apoase (100°—120°) nu prea multă vreme (1—2 ore). De aceea, soluţiile de aminoacizi pot fi sterilizate prin autoclavare. Aminoacizii sînt stabili la încălzire şi în soluţii acide, nu prea concentrate. Triptofanul însă este descompus în aceste condiţii; în schimb, el nu este distrus în soluţii alcaline (nu prea concentrate). În soluţii alcaline sînt însă descompuşi alţi aminoacizi (serina, treonina, cisteina, cistina).

1.2.2. SOLUBILITATEA

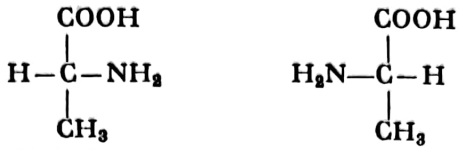
Toţi aminoacizii sînt solubili în apă; unii mai mult, alţii mai puţin. Foarte puţin solubili sînt tirozina şi cistina. Aminoacizii sînt foarte puţin solubili în alcoolii metilic şi etilic; excepţie face prolina care este solubilă. Clorhidraţii şi diclorhidraţii aminoacizilor bazici sînt mai solubili (atît în apă cît şi în alcool). De asemenea, sărurile lor de sodiu sînt mai solubile (atît în apă cît şi în alcool).

1.2.3. ACTIVITATEA OPTICĂ

Cu excepţia glicocolului, toţi α-aminoacizii cuprind carboni asimetrici în moleculele lor; deci se găsesc fiecare în cel puţin două forme izomere diferite. Spre exemplu, α-alanina, care cuprinde un carbon asimetric, se poate afla sub formă de doi enantiomeri optic-activi şi racemicul respectiv, inactiv.

Scanned with OKEN Scanner

În enantiomeri atomul de carbon asimetric are sau configurație dreaptă sau stîngă, ceea ce conduce la D-alanină și L-alanină:



D-alanina L-alanina

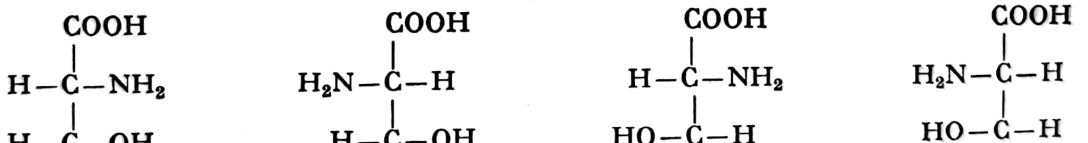
Trebuie remarcat faptul că în natură nu se află ambii enantiomeri ai α-alaninei ci numai unul. De asemenea, organismele vii sintetizează numai un enantiomer al aminoacidului. Cercetările au arătat că în toți aminoacizii naturali atomul de carbon asimetric din poziția α are configurație stîngă. Deci toți aminoacizii naturali aparțin seriei L (așa cum toate glucidele aparțin seriei D). În tabelul III.2 sînt menționate rotațiile specifice ale unor α-aminoacizi naturali.

Tabelul III.2

Rotațiile specifice ale unor L-aminoacizi

Aminoacidul	$[\alpha]_D^{25°}$
L-alanina	+ 1,8
Acidul L-glutamic	+12,0
L-lizina	+13,5
L-leucina	−11,0
L-fenilalanina	−34,5
Acidul L-aspartic	+ 5,0

Unii aminoacizi cuprind însă mai mulți carboni asimetrici. La aceștia (ca și în cazul zaharurilor) se întîlnește diastereometrie. Spre exemplu, aminoacidul treonină care cuprinde doi carboni asimetrici prezintă 4 izomeri (diastereomeri) optic-activi, grupați în două perechi de enantiomeri. În formulele următoare se specifică configurațiile atomilor de carbon asimetrici constitutivi, pentru izomerii treoninei:



DD LD DL LL

D-allotreonina L-treonina D-treonina L-allotreonina

În cazul aminoacizilor cu mai mulți carboni asimetrici în moleculă, în natură există de asemenea numai cîte o singură substanță din seria L. În cazul treoninei, în natură se găsește numai L-treonină.

1.3. PROPRIETĂȚILE ELECTROCHIMICE ALE AMINOACIZILOR

Aminoacizii sînt electroliți deoarece fiecare este *acid* și *bază*, datorită grupărilor funcționale —COOH și $—NH_2$ pe care le cuprind. Analiza röntgenografică a cristalelor de aminoacizi a arătat că acestea sînt constituite

Scanned with OKEN Scanner

din rețele de *ioni bipolari*. Ei se formează tocmai datorită naturii celor două grupări funcționale: carboxilul, cu tendința de a ceda protoni și amino, cu tendința de a accepta protonii cedați de carboxil. De aceea, formula generală a unui α-aminoacid trebuie scrisă astfel:

$$R-CH\begin{matrix}COO^-\\ NH_3^+\end{matrix}$$

Așa cum sărurile simple ($NaCl$, $CaCl_2$) în stare solidă sînt formate din rețele de ioni și pe care îi eliberează cînd se dizolvă în apă astfel încît și soluțiile lor cuprind ioni, aminoacizii se găsesc și în soluție (nu numai în stare solidă) sub formă de ioni bipolari. Acest fapt se desprinde imediat din cercetarea curbelor de titrare ale aminoacizilor.

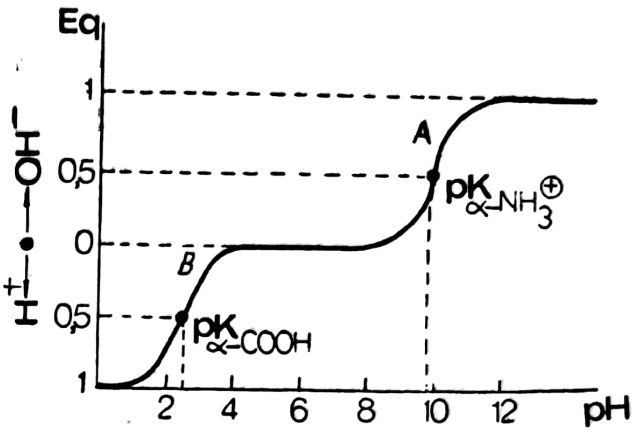


Fig. III.1. Curba de titrare a glicocolului.

Pentru început se va lua în considerare curba de titrare a glicocolului, aminoacid monoamino-monocarboxilic (fig. III.1).

La dizolvarea unui mol de glicocol în apă se obține o soluție cu pH 5,97 (adică o soluție cu reacție slab-acidă). Fenomenul se datorește, bineînțeles, grupării acide ($-NH_3^+$) care a eliberat protoni în soluție într-o măsură ceva mai mare decît are tendința să-i fixeze gruparea bazică ($-COO^-$). Aceasta înseamnă că gruparea acidă $-NH_3^+$ are o constantă de aciditate ceva mai mare decît constanta de bazicitate a grupării $-COO^-$.

Efectuîndu-se titrarea grupării acide a soluției molare de glicocol și apreciind în echivalenți cantitatea de hidroxid adăugat, se constată că este nevoie să se adauge o cantitate considerabilă de bază (1 echivalent de NaOH) pentru a atinge pH-ul corespunzător regiunii bazice (pH = 12). Pe de altă parte, se constată că variația pH-ului soluției în timpul adăugării hidratului are alura ramurei A a curbei din fig. III.1 (cu un punct de inflexiune în preajma valorii pH = 9,8). Faptul că pentru această titrare s-a folosit 1 echiv. de bază dovedește că glicocolul cuprinde într-un mol, 1 echivalent de grupare acidă. Curba de variație a pH-ului, în funcție de cantitatea de bază adăugată (ramura A), arată că pentru cantități egale de bază, pH-ul variază diferit: pentru 0,2 echivalenți de la 5,97 la 9, iar pentru cea mai mare cantitate de bază (0,2—0,8 echivalenți) variază în limite foarte strînse, de la 9 la 11. Interpretarea acestui fapt rezultă imediat dacă se ia în considerație următoarea reacție care a avut loc în soluția aminoacidului la adăugarea bazei:

$$H_2C\begin{matrix}COO^-\\ NH_3^+\end{matrix} + HO^- \rightarrow H_2O + H_2C\begin{matrix}COO^-\\ NH_2\end{matrix}$$

amfiion — anion

Pentru fiecare ion HO^- al bazei un amfiion cedează un proton trecînd în anion.

Atîta vreme cît prin adaos de bază nu au fost neutralizați toți protonii (aflați în grupările acide ale tuturor amfiionilor), în soluția aminoacidului coexistă amfiioni și anioni. Împreună, aceștia constituie în soluție un sistem

Scanned with OKEN Scanner

tampon în care componenta acidă, donorul de protoni, este amfiionul (cu grup cationic $-NH_3^+$) iar componenta bazică este acceptorul de protoni, anionul (cu grup NH_2).

Bineînțeles, corespunzător modificării concentrațiilor pe care le capătă donorul și acceptorul — ca urmare a adăugării de bază — se modifică și pH-ul soluției, așa cum arată ecuația Henderson-Hasselbalch, scrisă în forma ei cea mai generală:

$$pH = pK_a + \log \frac{[\text{acceptor } H^+]}{[\text{donor } H^+]}$$

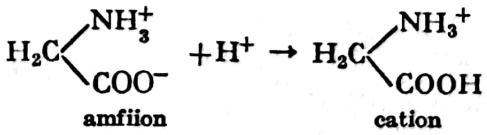
adică:

$$pH = pK_a + \log \frac{[\text{anion}]}{[\text{amfiion}]}$$

în care K_a = constanta de aciditate a grupării $-NH_3^+$.

Este ușor de înțeles că în timpul adăugării de NaOH se ajunge la un moment dat ca proporția de amfiioni să fie egală cu cea de anioni (ceea ce are loc cînd jumătate din cantitatea de amfiioni a fost transformată în anioni). În acest caz, în ecuația Henderson-Hasselbalch fracția este unitară, logaritmul ei este nul iar pH-ul devine egal cu $pK_a = 9{,}6$. Este tocmai situația în care sistemul tampon își manifestă maximum de capacitate-tampon făcînd să varieze puțin pH-ul mediului (9—11) la adăugarea celei mai mari porțiuni de bază (0,2—0,8 echivalenți).

Cînd se titrează gruparea bazică ($-COO^-$) și cantitatea de acid se apreciază în echivalenți, se constată că este nevoie de introducerea unui echivalent de acid pentru ca pH-ul soluției molare de glicocol să scadă pînă aproape de valoarea 1. Folosirea la titrare a unui echivalent de acid arată că s-a neutralizat 1 echivalent de grupare bazică din glicocol. Corespunzător situației cercetate anterior, și în acest caz, la adăugarea celei mai mari proporții de acid (0,2—0,8 echivalenți) pH-ul soluției a variat puțin, între 3,5—2. În acest fel se explică alura ramurei B a curbei. Deci și în cazul titrării grupei bazice ($-COO^-$) se formează un sistem-tampon care se opune variației pH-ului, însă de data aceasta, la adăugare de acid, are loc reacția:



amfiion cation

Pentru fiecare proton fixat de gruparea bazică, un amfiion (acceptor de protoni) trece în cation (donor de protoni) iar la adăugarea de acid, pH-ul soluției variază în funcție de concentrațiile diferite pe care le iau donorul și acceptorul.

De data aceasta, ecuația Henderson-Hasselbalch devine:

$$pH = pK_a + \log \frac{[\text{amfiion}]}{[\text{cation}]}$$

în care K_a = constanta de aciditate a acidului conjugat — COOH grupului $-COO^-$ (bază anionică).

Cînd în soluție concentrațiile donorului și acceptorului de protoni devin egale, pH-ul ajunge egal cu $pK_a = 2{,}34$. În această regiune (vezi ramura B a curbei din fig. III.1) se exercită efect tampon maxim; pH-ul soluției variază puțin pentru un adaos relativ mare de acid (0,2—0,8 echiv.).

Scanned with OKEN Scanner

Regiunea centrală a curbei din fig. III.1 corespunde situației în care soluției apoase de glicocol, cu pH=5,97, nu i s-a adăugat nici acid și nici bază (este plasată în dreptul valorii zero echivalenți de bază sau acid). În această situație aminoacidul se află numai sub formă de amfiion (fără sarcină netă) fiind ionizat în egală măsură la gruparea acidă și la gruparea bazică.

Concentrația ionilor de hidrogen din mediu pentru care un aminoacid se află ionizat în egală măsură la grupările acidă și bazică se numește punct izoelectric al acelui aminoacid, *I* iar pH-ul este *pI*. Dacă aminoacidul este monoamino-monocarboxilic (ca glicocolul) se demonstrează că:

$$I = \sqrt{K_a \times K_a'}, \text{ iar } pI = \frac{1}{2}(pK_a + pK_a') \text{ (în care } K_a \text{ și } K_a',$$

sînt ce le două constante de aciditate ale aminoacidului).

În ansamblu, curba de titrare a glicocolului pune în evidență două regiuni de pH în care soluția respectivă exercită efect tampon (în preajma pK_a și pK_a') și o a treia regiune distinctă în preajma punctului izoelectric.

Și pentru alți aminoacizi monoamino-monocarboxilici există cîte un punct izoelectric în aceeași relație cu valorile pK_a respective, ca și la glicocol. Pentru acești aminoacizi valorile pI sînt cuprinse — în genere — între 5,5 și 6,3.

În cazul aminoacizilor monoaminodicarboxilici, de felul acidului aspartic, se deosebesc la curba de titrare respectivă două valori pK_a', pentru acizii conjugați ai celor două grupări (de baze anionice) $-COO^-$ și o a treia valoare pK_a=9,82 pentru gruparea acidă $-NH_3^+$ a aminoacidului (fig. III.2). Punctul izoelectric al acestui aminoacid este plasat în regiunea acidă, la valoarea medie a celor două valori pK_a', corespunzătoare grupelor carboxilice. În cazul acidului aspartic, pK_a'=2,09 pentru $-COO^-$ din α și pK_a'=3,86 pentru $-COO^-$ din γ:

$$pI = \frac{2,09+3,86}{2} = 2,97$$

În cazul aminoacizilor diaminomonocarboxilici, de felul lizinei, se deosebesc la curba de titrare două valori pK_a pentru grupările aminice protonate din α și din ε și o valoare pK_a'=2,18 pentru acidul conjugat grupării $-COO^-$ (fig. III.3). Punctul izoelectric al aminoacidului este plasat în regiunea bazică,

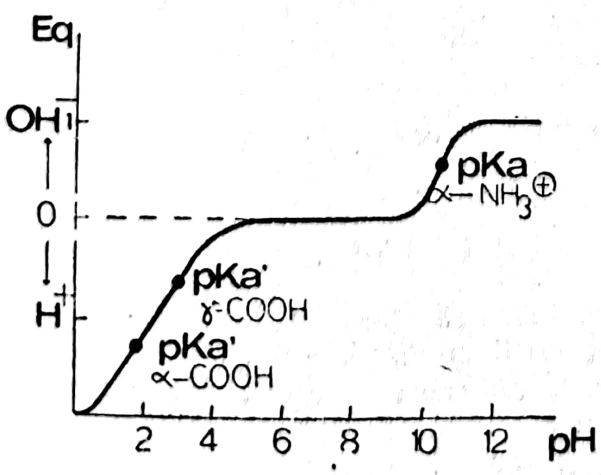


Fig. III.2. Curba de titrare a acidului aspartic.

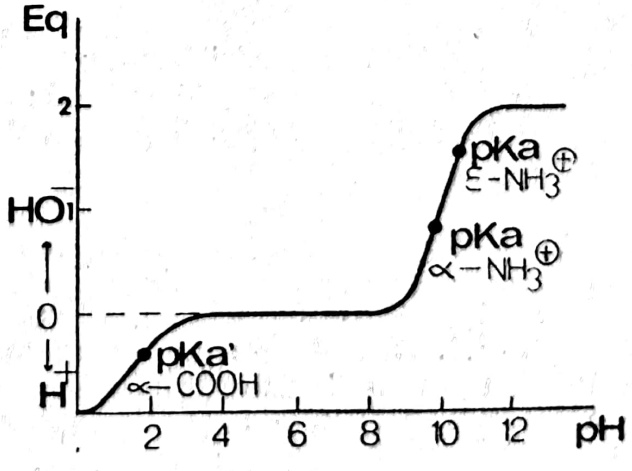


Fig. III.3. Curba de titrare a lizinei.

la valoarea medie a celor două valori pK_a corespunzătoare grupărilor aminice protonate; $pK_a = 8{,}95$ pentru NH_3^+ din α și $pK_a = 10{,}53$ pentru NH_3^+ din ε:

$$pI = \frac{8{,}95 + 10{,}53}{2} = 9{,}74$$

Datorită numărului grupărilor funcționale —COOH și $—NH_2$ pe care le cuprind precum și valorilor pK_a corespunzătoare acestor grupări, diverșii α-aminoacizi au puncte izoelectrice foarte diferite, plasate în toate regiunile scării de pH (tabelul III.3).

Tabelul III.3

Valorile pI ale principalilor α-aminoacizi

glicocol	5,97	lizină	9,74
alanină	6,00	fenilalanină	5,48
valină	5,96	tirozină	5,66
leucină	5,98	triptofan	5,89
izoleucină	6,02	histidină	7,59
acid aspartic	2,77	prolină	6,30
asparagină	5,41	hidroxiprolină	5,83
acid glutamic	3,22	serină	5,68
glutamină	5,65	cisteină	5,10
arginină	10,76	metionină	5,74

Comportarea aminoacizilor în cîmp electric este strîns corelată cu valoarea pH-ului mediului în care el se află. Astfel:

— la pI aminoacidul nu migrează în cîmp electric;

— la pH<pI aminoacidul migrează la catod căci este încărcat pozitiv, aflîndu-se sub formă de cation: $H_3^+N—CH(R)—COOH$;

— la pH>pI aminoacidul migrează la anod deoarece se află încărcat negativ, ca anion: $H_2N—CH(R)—COO^-$.

1.4. PROPRIETĂȚILE CHIMICE ALE AMINOACIZILOR

Datorită grupărilor funcționale —COOH și NH_2 pe care le cuprind, aminoacizii participă la numeroase reacții date de aceste grupări. Unele dintre ele sînt reacții importante din punct de vedere biochimic și pot fi grupate în trei categorii:

— reacții ale grupării amino;

— reacții ale grupării carboxil;

— reacții la care participă ambele grupări funcționale (amino și carboxil).

1.4.1. REACȚIILE GRUPĂRII AMINO

Dintre acestea, mai importante sînt următoarele:

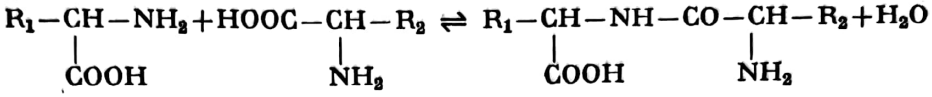
1.4.1.1. *Neutralizarea.* În reacție cu acizii minerali, aminoacizii își salifică gruparea amino și neutralizează gruparea anionică $—COO^-$. Spre exemplu, în reacție cu HCl se obțin clorhidrați:

$$R—\underset{\displaystyle COO^-}{\underset{|}{CH}}—NH_3^+ + HCl \rightarrow R—\underset{\displaystyle COOH}{\underset{|}{CH}}—NH_3^+ + Cl^-$$

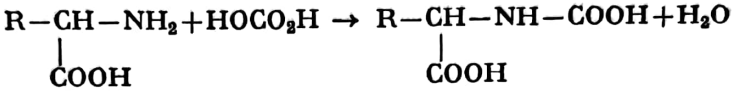
Scanned with OKEN Scanner

1.4.1.2. *Reacţii de substituţie.* Cele mai importante sînt reacţiile de substituţie a unuia sau a ambilor atomi de hidrogen de la grupul amino (neprotonat) cu diverşi radicali.

a) *Substituţia cu resturi acil.* Cînd restul acil provine de la un alt aminoacid, rezultă peptide. Spre exemplu, din reacţia între doi aminoacizi se obţine un dipeptid:

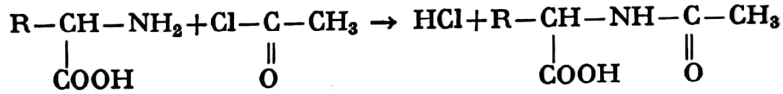


O reacţie specială de acilare a grupării aminice neprotonate este cu acid carbonic, rezultînd un acid carbaminic:



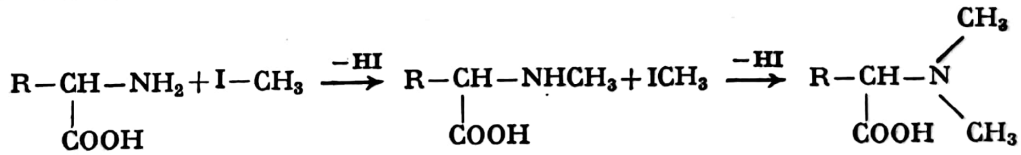
Reacţia aceasta are loc la transportul bioxidului de carbon de către hemoglobină.

Pentru acilare cu radicalul acidului acetic se foloseşte clorura de acetil:

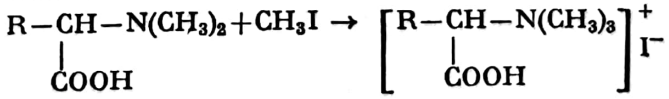


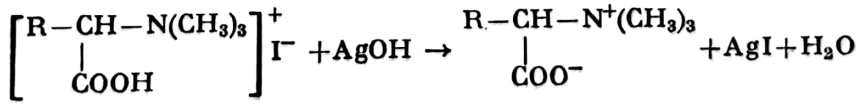
Din reacţie rezultă derivaţi acetilaţi ai racemicului aminoacidului. În organism, din asemenea produse, sub acţiunea diverselor enzime pancreatice, biliare sau renale, se liberează aminoacidul dar numai în una din formele optic-active. Aceasta denotă că enzimele respective acţionează numai asupra derivatului acetilat al unuia din izomerii optici, eliberîndu-l numai pe el.

b) *Metilarea.* Prin tratarea aminoacidului cu iodură de metil se realizează substituţia — parţială sau totală — a atomilor de hidrogen din grupul amino cu radicali metil:

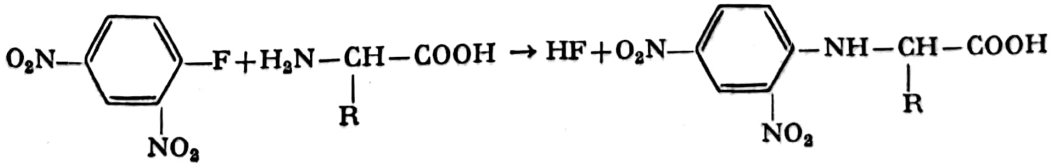


În prezenţa unui exces de ICH_3 se obţine sarea cuaternară de amoniu a aminoacidului iar aceasta prin tratare cu hidroxid de argint (AgOH) trece în *betaina* aminoacidului:



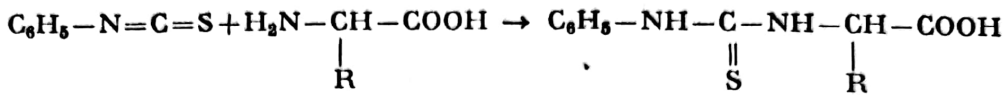


c) *Reacţia cu dinitrofluorobenzen* (reacţia Sanger). Această reacţie prezintă deosebit interes din punct de vedere analitic căci serveşte la separarea şi recunoaşterea aminoacizilor. Reacţia are loc în mediu slab alcalin între fluorodinitrobenzen şi aminoacizi, conform ecuaţiei:



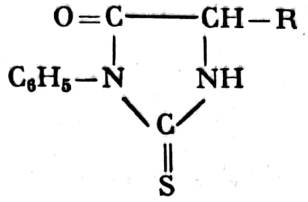
Dinitrofenilderivaţii rezultaţi sînt compuşi de culoare galbenă stabili. Prin hidroliză acidă liberează aminoacizii în stare pură.

d) *Reacţia cu fenilizotiocianat (reacţia Edman).* Fenilizotiocianatul se condensează, în mediu alcalin, cu gruparea $-NH_2$ a α-aminoacizilor (sau a unei peptide):



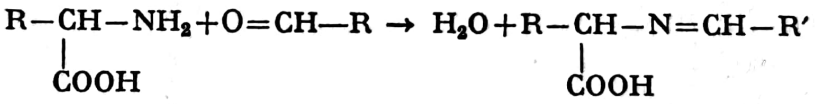
fenilizotiocarbamilaminoacid (PTC-aminoacid)

Prin încălzire, în mediu acid, PTC-aminoacidul se ciclizează transformîndu-se în 3-fenil-2-tiohidantoina (PTH) acidului aminat:

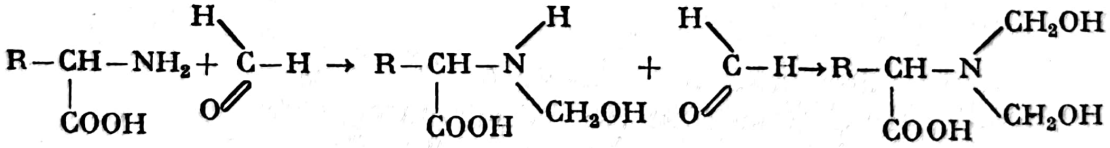


Aceşti compuşi pot fi uşor identificaţi prin tehnici cromatografice. Reacţia Edman stă deci la baza unei metode foarte importante de determinare a structurii proteinelor.

1.4.1.3. *Reacţii de condensare.* Dintre acestea, cea mai importantă este reacţia de condensare cu aldehidele conducînd la formare de baze Schiff:

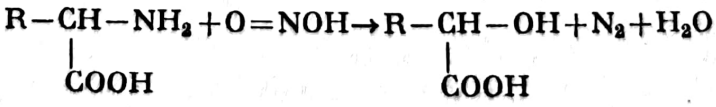


În prezenţa aldehidei gruparea aminică din aminoacid se maschează prin crearea unui N-hidroximetil derivat:



Această reacţie stă la baza formoltitrării aminoacizilor prin metoda Sörensen.

1.4.1.4. *Dezaminarea* aminoacizilor are loc relativ uşor prin reacţia lor cu acid azotos:



În urma acestei reacţii, pentru fiecare moleculă de aminoacid, se dezvoltă o moleculă de azot. Determinarea cantităţii de azot eliberată permite stabilirea numărului de grupări aminice reactante.

Reacţia stă la baza metodei Van Slyke folosită pentru determinarea numărului grupărilor amino libere din proteine sau din aminoacizi.

Scanned with OKEN Scanner

1.4.2. REACȚIILE GRUPĂRII CARBOXIL

Acestea sînt reacțiile generale ale acizilor organici.

1.4.2.1. *Ionizarea și formarea sărurilor.* În soluții neutre aminoacizii monoaminomonocarboxilici se comportă ca amfioni:

$$H_3N^+-\underset{\displaystyle R}{\underset{|}{CH}}-COO^- \xrightarrow{+NaOH} H_2O+H_2N-\underset{\displaystyle R}{\underset{|}{CH}}-COONa$$

Grupările —COOH din pozițiile γ sau δ ale acizilor aspartic și glutamic (aminoacizi monoaminodicarboxilici) și gruparea $-NH_2$ din poziția ε a lizinei (aminoacid diaminomonocarboxilic) precum și unul din atomii de azot ai nucleului imidazolic din histidină au, de asemenea, capacitatea să accepte sau să doneze protoni.

1.4.2.2. *Esterificarea.* În reacție cu alcoolii, aminoacizii dau naștere la esteri:

$$H_2N-CHR-COOH+HOR' \rightarrow H_2O+H_2N-CHR-COOR'$$

Esterii aminoacizilor sînt, în general, substanțe lichide. Ei sînt utilizați pentru sinteza organică a peptidelor.

1.4.2.3. *Formarea amidelor.* Sub acțiunea amoniacului aminoacizii dau naștere la amide:

$$R-\underset{\displaystyle NH_2}{\overset{\displaystyle COOH}{CH}} + HNH_2 \rightarrow R-\underset{\displaystyle NH_2}{\overset{\displaystyle CONH_2}{CH}} + H_2O$$

Reacția poate avea loc și cu o amină:

$$R-\underset{\displaystyle NH_2}{\underset{|}{CH}}-COOH+H_2N-R' \rightarrow R-\underset{\displaystyle NH_2}{\underset{|}{CH}}-CO-NH-R'+H_2O$$

1.4.2.4. *Decarboxilarea.* În anume condiții aminoacizii se decarboxilează ușor conducînd la amine:

$$H_2N-CHR-COOH-CO_2 \rightarrow H_2N-CH_2R$$

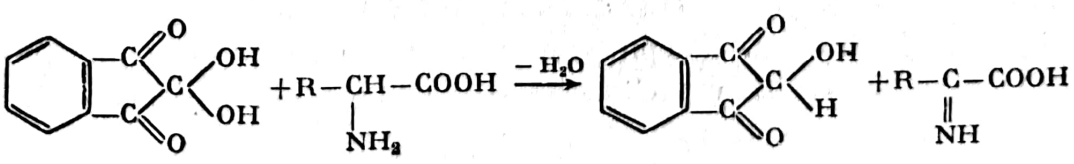
Această reacție este folosită de organisme pentru una din căile de degradare enzimatică a aminoacizilor. Enzimele care catalizează reacția sînt decarboxilazele.

1.4.3. REACȚII LA CARE PARTICIPĂ SIMULTAN GRUPĂRILE NH_2 ȘI COOH

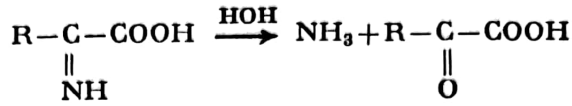
Dintre acestea cea mai importantă este reacția cu ninhidrină.

Reacția cu ninhidrină decurge în mai multe etape:

— în etapa I-a ninhidrina oxidează — prin dehidrogenare α-aminoacidul transformîndu-l în iminoacid și ea se reduce în hidrindantin:

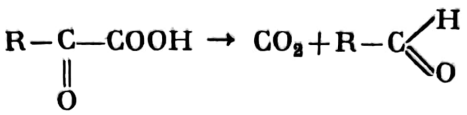


— în etapa a II-a iminoacidul se hidrolizează conducînd la amoniac şi α-cetoacid:

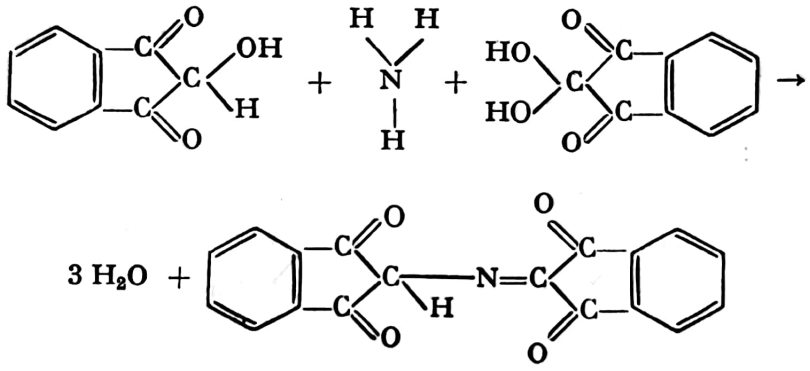


— etapa a III-a corespunde reacţiei de decarboxilare a cetoacidului cu formarea unei aldehide şi CO_2.

Ambele produse se pot determina cu precizie (ca de altfel şi amoniacul eliberat în etapa anterioară):



— în etapa a IV-a amoniacul (format în etapa a II-a) se condensează cu molecula de hidrindantin (format în prima etapă) şi cu o moleculă de ninhidrină (ca atare), conducînd la un produs colorat în albastru:



Această reacţie stă la baza determinării cantitative a α-aminoacizilor din sînge, urină şi din alte fluide biologice care-i pot cuprinde. Prolina şi hidroxiprolina dau în reacţie cu ninhidrina produse colorate în galben.

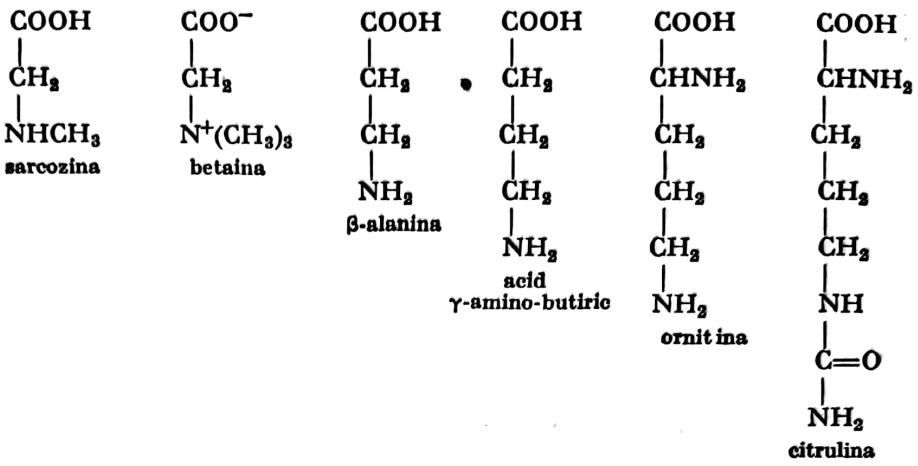
1.5. ALŢI AMINOACIZI DE INTERES BIOCHIMIC

În afară de α-aminoacizii care intră — în mod curent — în constituţia proteinelor, în natură se mai întîlnesc o serie de aminoacizi importanţi din punct de vedere biochimic. Unii din ei se află în stare liberă (în microorganisme); alţii intră drept constituenţi ai cîtorva peptide sau proteine cu greutate moleculară mică. Deşi unii din aceşti aminoacizi sînt cunoscuţi de multă vreme, majoritatea lor au fost izolaţi şi cercetaţi numai în ultimul timp, cu ajutorul celor mai moderne metode de biochimie analitică.

Dintre aceşti aminoacizi, prezintă un interes mai deosebit următorii sarcozina şi betaina, proveniţi prin metilarea glicocolului; β-alanina care intră în constituţia unor dipeptide (carnozina şi anserina) precum şi în constituţia unei vitamine din complexul B (acidul pantotenic) şi în constituţia coenzimei A; acidul γ-aminobutiric care îndeplineşte roluri metabolice importante la nivelul ţesutului cerebral; ornitina şi citrulina care se găsesc, în special, în ficat şi iau parte la biosinteza ureei.

Scanned with OKEN Scanner

Formulele structurale ale aminoacizilor menţionaţi aici sînt:



1.6. IDENTIFICAREA ŞI DOZAREA AMINOACIZILOR

1.6.1. REACŢII DE CULOARE

Pentru identificarea şi dozarea α-aminoacizilor se folosesc — în primul rînd — reacţiile de culoare pe care aceştia le dau cu diverşi reactivi (vezi reacţiile chimice ale aminoacizilor). Dintre reacţiile de culoare cea mai utilizată este reacţia cu ninhidrina în urma căreia toţi α-aminoacizii, în afară de prolină şi hidroxiprolină, dau produşi de culoare albastră, cu maxim de absorbţie la 570 nm. După cum s-a mai menţionat, prolina şi hidroxiprolina dau cu ninhidrina produşi de culoare galbenă cu maxim de absorbţie la 440 nm.

1.6.2. SPECTRE DE ABSORBŢIE ÎN ULTRAVIOLET

Aminoacizii aromatici (fenilalanina, tirozina, triptofanul) prezintă spectre de absorbţie cu maxime caracteristice în ultraviolet (fig. III.4). Pe baza determinărilor de absorbţie la lungimile de undă în jurul valorilor 260 nm (pentru fenilalanină) şi 280 nm (pentru tirozină şi triptofan) se pot doza aminoacizii respectivi din soluţii în care se află amestecaţi cu alţi aminoacizi.

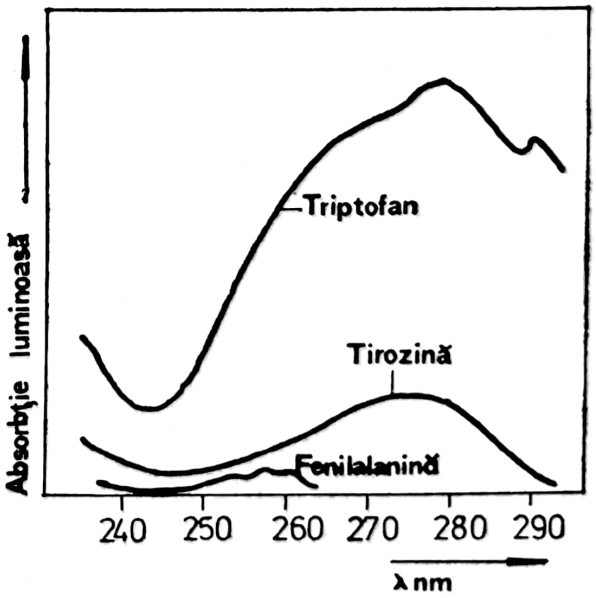


Fig. III.4. Spectrele de absorbţie în ultraviolet ale aminoacizilor aromatici.

1.6.3. METODE MICROBIOLOGICE (DUNN, SNELL)

Există două tipuri de metode microbiologice. Primul tip se bazează pe principiul că aminoacizii sînt indispensabili pentru dezvoltarea unor anumite microorganisme (bacterii lactice sau „mutanţi" de germeni obişnuiţi). În consecinţă, dacă într-un mediu de cultură lipseşte un

Scanned with OKEN Scanner

singur aminoacid indispensabil pentru creşterea microorganismului, se constată că acesta nu se dezvoltă. Adăugîndu-se aminoacidul care lipsea, microorganismul începe să se dezvolte, proporţional cu cantitatea de aminoacid adăugată. Intensitatea dezvoltării microorganismului se poate determina: prin comparaţie cu curbele martor de creştere stabilite în prealabil, prin măsurarea turbidităţii mediului direct proporţională cu dezvoltarea, prin dozarea unui metabolit produs de microorganisme (în genere, acid lactic).

Al doilea tip de metode microbiologice se bazează pe faptul că unele microorganisme conţin enzime specifice de degradare pentru anumiţi aminoacizi, spre exemplu decarboxilaze care catalizează decarboxilarea aminoacidului cu liberare de bioxid de carbon, măsurabil manometric. Se poate determina în acest fel acidul glutamic în urma acţiunii glutamic-decarboxilazei din *Clostridium welchii*, tirozina în urma acţiunii tirozin-decarboxilazei din *Streptococcus fecalis* etc. Acest tip de metode microbiologice este foarte precis şi specific.

Metodele microbiologice sînt folosite adesea pentru depistarea unor boli ereditare ale metabolismului aminoacizilor.

1.6.4. METODA DILUŢIEI IZOTOPICE (RITTENBERG ŞI FOSTER)

Această metodă se bazează pe: (1) introducerea unui aminoacid marcat (spre exemplu cu azot greu ^{15}N) într-un amestec de aminoacizi; (2) izolarea ulterioară a unei probe din acest aminoacid şi (3) determinarea concentraţiei izotopului în proba izolată. Se înţelege că amestecarea moleculelor marcate de aminoacid introdus cu moleculele preexistente şi nemarcate ale aceluiaşi aminoacid conduce la diluarea izotopului. Cunoscînd această diluare — adică cele două concentraţii (iniţială şi finală) ale izotopului — şi cantitatea de substanţă marcată adăugată, se poate calcula cantitatea aminoacidului nemarcat din amestecul iniţial. Formula utilizată pentru calcul este:

$$x = a\left(\frac{SA_1}{SA_2} - 1\right)$$

în care:

x = cantitatea de aminoacid dozat din amestec;
a = cantitatea de aminoacid radioactiv introdus în amestec;
SA_1 = activitatea specifică a aminoacidului marcat şi introdus în amestec;
SA_2 = activitatea specifică a aminoacidului scos (extras) din amestec.

Precizia metodei de diluţie este foarte mare.

1.6.5. METODE CROMATOGRAFICE

Metodele cromatografice se bazează pe afinitatea diferită pe care o are o substanţă faţă de două faze lichide deosebite nemiscibile sau miscibile numai parţial. Datorită afinităţii diferite, substanţa se repartizează inegal între cele două faze. În general, una din faze este staţionară (faza imobilă), fiind fixată pe un suport solid iar cealaltă se află în mişcare continuă (faza mobilă). În timpul deplasării fazei mobile se stabileşte — în permanenţă — un echilibru între proporţiile de substanţă repartizate în cele două faze.

Scanned with OKEN Scanner

Dacă în locul unei singure substanţe se află mai multe (un amestec), fenomenele de repartizare inegală între faze şi de stabilire a echilibrului au loc în mod specific pentru fiecare substanţă în parte. Ca urmare a acestui fapt, substanţele pot fi separate individual din amestec (fig. III.5).

În funcţie de natura forţelor care acţionează la stabilirea echilibrului se deosebesc următoarele tipuri de cromatografie: de partiţie, de schimb ionic şi de difuzie în gel. Principiile acestor tipuri de cromatografie sînt expuse şi ilustrate — pe scurt — în cele ce urmează:

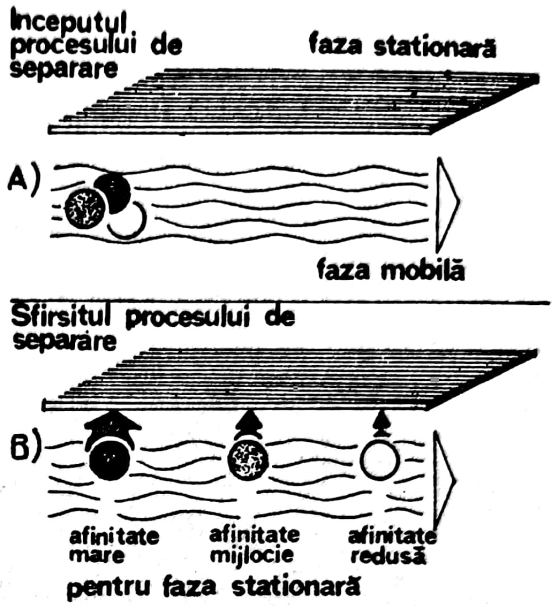


Fig. III.5. Principiul separării cromatografice.

1.6.5.1. *Cromatografia de partiţie.* Pentru analiza aminoacizilor cromatografia de partiţie se practică, în special, sub forma *cromatografiei pe hîrtie* (Martin, Gordon, Synge) şi a *cromatografiei în strat subţire.* Ambele procedee sînt principial asemănătoare şi permit o separare netă a unor cantităţi foarte mici de substanţe. Deosebirea constă în faptul că la cromatografia pe hîrtie suportul pentru faza staţionară este o hîrtie de filtru specială iar la cromatografia în strat subţire suportul fazei staţionare este, în general, celuloza sau silicagelul dispus într-un strat foarte subţire pe o placă de sticlă sau de material plastic. În ambele procedee faza staţionară este apa iar faza mobilă este reprezentată de un solvent organic sau de un amestec de solvenţi organici care conţin apă (sînt saturaţi cu apă).

Cînd cromatografia de partiţie este utilizată pentru separarea, identificarea şi eventual dozarea aminoacizilor dintr-un amestec, acesta se aplică la unul din capetele foii de hîrtie de filtru sau al plăcii de sticlă acoperite ci hîrtia sau placa se introduce într-o incintă închisă a cărei atmosferă este saturată cu vapori de apă şi cu vaporii celuilalt sau celorlalţi solvenţi care sonstituie faza mobilă (fig. III.6).

Prin migrarea peste suportul solid, faza mobilă antrenează aminoacizii din amestec şi îi deplasează corespunzător afinităţii lor specifice faţă de faza staţionară. Cu puţin timp înainte ca faza mobilă să ajungă la capătul hîrtiei de filtru (sau al plăcii de sticlă) aceasta se scoate din incinta unde s-a făcut migrarea, se usucă şi se colorează prin pulverizare cu o soluţie de ninhidrină. Plasarea fiecărui aminoacid este marcată printr-o pată colorată. Această plasare corespunde unei mărimi caracteristice, notată R_F, care este raportul dintre drumul parcurs în timpul migraţiei de aminoacidul dizolvat şi drumul (frontul) fazei mobile. Pentru o evaluare cantitativă a aminoacizilor, intensitatea culorii petelor (spoturilor) care iau naştere se măsoară prin metode optice.

Este de remarcat că există o strînsă interdependenţă între constituţia lanţurilor laterale ale unui aminoacid şi viteza sa de migrare (fig. III.7). Într-adevăr, aminoacizii cu catene hidrocarbonate hidrofobe mai mari (valina,

Scanned with OKEN Scanner

leucina, izoleucina, fenilalanina, tirozina, triptofanul, metionina) migrează mai departe decît cei cu catene hidrofobe mai scurte (glicină, alanină, prolină) sau decît cei cu catene hidrofile (cisteină, serină, treonină, acid aspartic, acid glutamic, lizină, arginină, histidină).

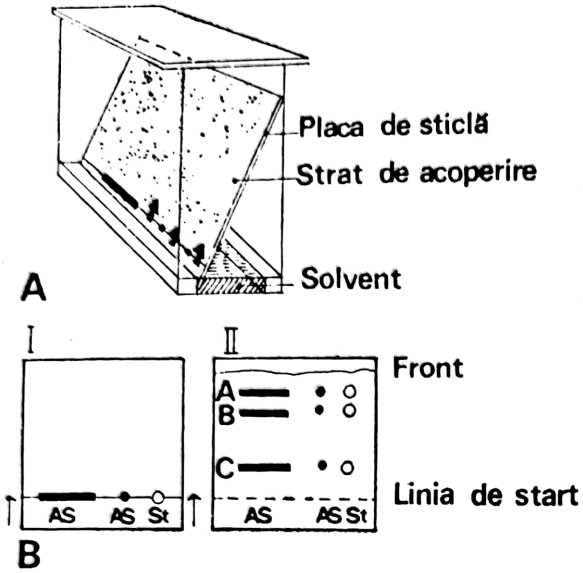


Fig. III.6. Ilustrarea cromatografiei de partiție.

A = placa cu strat subțire în camera cromatografică saturată cu vapori de apă și solvenți organici; B=placa cu strat subțire înainte (I) și după developare (II); AS = amestecul de substanțe cu componentele A, B și C aplicate în linie sau punctiform; St = standard de substanțe cunoscute, pentru comparație.

Migrarea diferențiată a aminoacizilor — în funcție de natura catenei hidrocarbonate — este determinată de afinitatea mai mare pe care o au aminoacizii cu catene hidrofile pentru faza staționară (apoasă) și cei cu catene hidrofobe pentru faza mobilă (solvent organic).

În cazul analizei unor amestecuri complexe de aminoacizi (spre exemplu, în cazul analizei unui hidrolizat proteic), este necesar să se practice cromatografia bidimensională (fig. III.8), folosindu-se un solvent organic cu migrare

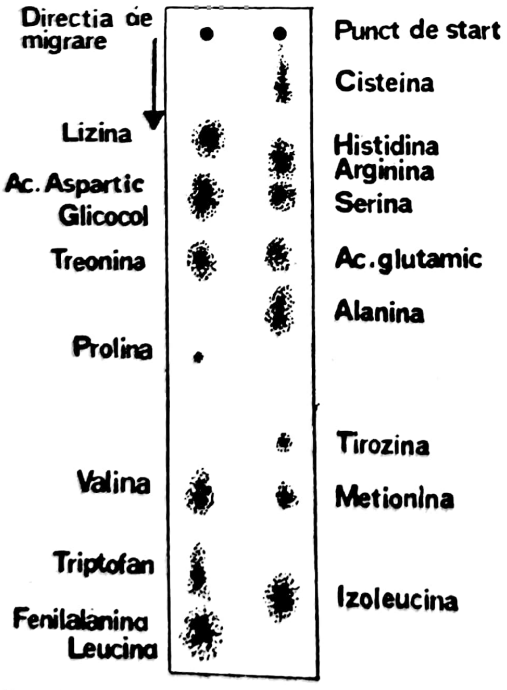


Fig. III.7. Cromatografia unidimensională pe hîrtie a unor aminoacizi din constituția proteinelor.

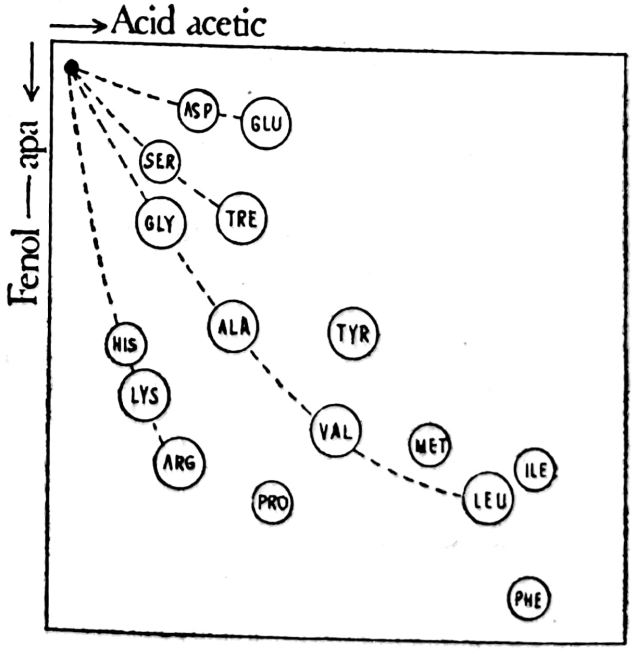


Fig. III.8. Cromatografia bidimensională pe hîrtie a unor aminoacizi din constituția proteinelor.

Scanned with OKEN Scanner

într-un sens şi un alt solvent organic cu migrare în sens perpendicular pe primul. În asemenea cazuri, aminoacizii sînt relevaţi cu ninhidrină, la cald.

După cum se observă în fig. III.8, aminoacizii din acelaşi grup sînt plasaţi în lungul aceleiaşi curbe (marcată punctat în figură).

1.6.5.2. *Cromatografia de schimb ionic* (Moore, Stein). Acest tip de cromatografie se practică în coloane de sticlă umplute cu răşini schimbătoare de ioni. În general, asemenea răşini sînt polimeri (cu grad mare de polimerizare), insolubili, cuprinzînd grupe polare ionizabile şi susceptibile a schimba un ion cu altul. Există schimbători de ioni cationici (conţinînd grupări sulfonice sau carboxilice) şi schimbători de ioni anionici (conţinînd grupări aminice). Ţinînd seama de faptul că afinitatea unui aminoacid pentru un schimbător cationic depinde de constanta de disociere a grupării aminice, modul de funcţionare al unui asemenea schimbător de ioni poate fi schematizat astfel:

$$R-SO_3^-H^+ + R'-NH_3^+ \rightarrow R-SO_3^-NH_3^+ + R'-H^+.$$

Cu cît aminoacidul este mai bazic cu atît el rămîne mai legat prin forţe electrostatice de răşina schimbătoare de ioni. Dacă se trece ulterior pe coloană un lichid eluant cu pH de valori crescînde (gradient de pH) sarcina electrică netă a aminoacizilor se modifică şi cînd pH-ul eluantului se apropie de pI-ul aminoacidului acesta se desprinde de pe coloană şi o traversează pînă la capăt odată cu eluantul. Deoarece valorile pI ale diverşilor aminoacizi sînt diferite, aceştia ies din coloană pe rînd: în ordinea inversă afinităţii lor pentru răşină.

Cromatografia aminoacizilor pe răşini schimbătoare de ioni se practică actualmente în două variante (a şi b).

a) Folosind un colector de fracţii se primesc de pe coloană fracţiuni mici de eluat care cuprind aminoacizi. În fiecare probă colectată se dezvoltă — la cald — reacţia de culoare cu ninhidrină. Intensitatea de culoare a soluţiei din fiecare eprubetă se determină spectrofotometric şi se calculează concentraţia în aminoacizi. Se obţine astfel o serie de curbe corespunzătoare fiecărui aminoacid (fig. III.9).

b) Cu ajutorul unui analizor automat determinările se fac cu foarte mare exactitate, dozîndu-se precis cantităţi foarte mici de aminoacizi (de ordinul a

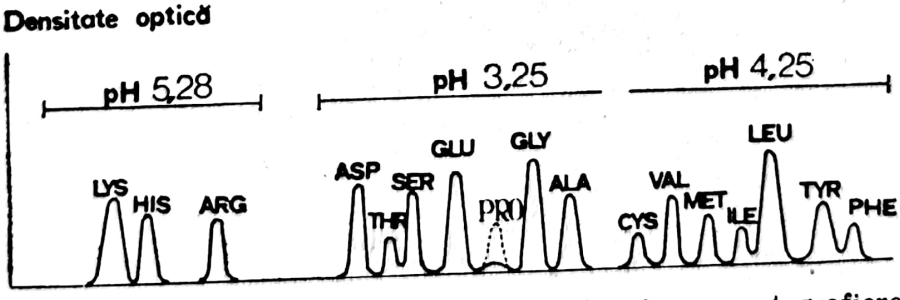


Fig. III.9. Natura aminoacizilor stabilită prin cromatografiere pe răşini schimbătoare de ioni (varianta a).

10 nanomoli). În principiu, se procedează astfel: lichidul care iese din coloană se amestecă cu ninhidrină, cu ajutorul unei pompe. Amestecul astfel obţinut este încălzit într-o baie de apă şi trecut într-un spectrofotometru în care se citeşte, la 570 nm absorbţia luminoasă a produsului colorat în violet rezultat din reacţia ninhidrinei cu ansamblul aminoacizilor şi la 440 nm, a produsului galben rezultat din reacţia ninhidrinei cu prolina. Aceste lecturi

sînt înregistrate pe o foaie de hîrtie. Suprafaţa cuprinsă între curbă şi linia de bază este proporţională cu concentraţia aminoacizilor (fig. III.10).

1.6.5.3. *Cromatografia de difuzie în gel.* În acest gen de cromatografie, care se mai numeşte şi *cromatografie de cernere moleculară*, separarea substan-

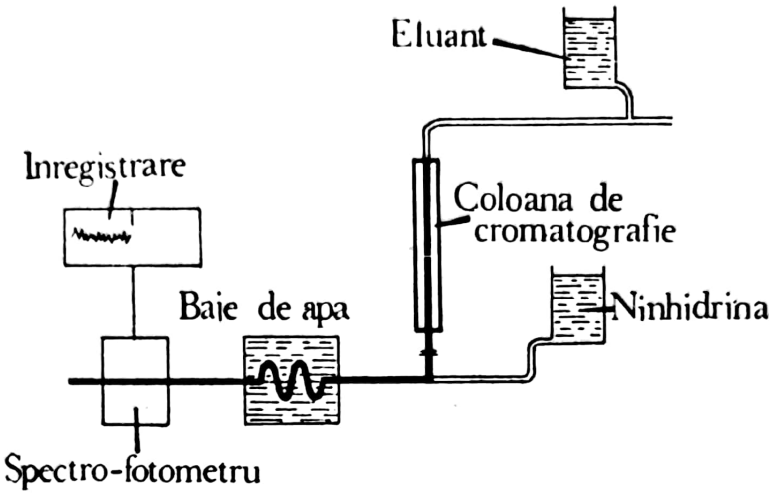


Fig. III.10. Schema analizei automate a unui amestec de aminoacizi (————= traiectul parcurs de aminoacizi).

ţelor din amestecuri are loc pe baza diferenţelor de mărime a moleculelor (şi nu a greutăţilor moleculare). Această metodă serveşte, în special, pentru separarea aminoacizilor de peptide şi de proteine, precum şi pentru separarea pro-

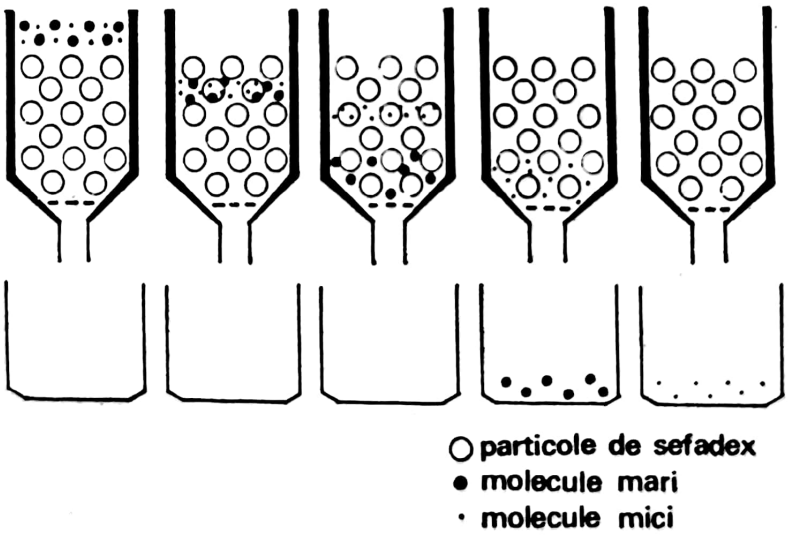


Fig. III.11. Cromatografia de cernere moleculară. ○ = particule de gel; ● = molecule mari; · = molecule mici.

teinelor individuale din amestecurile lor. În vederea practicării cromatografiei de cernere moleculară se tratează cu apă geluri de dextran (denumirea comercială Sephadex) sau de poliacrilamidă (denumirea comercială Biogel) şi se introduc într-o coloană de sticlă montată vertical. O parte din apa cu care s-a tratat gelul respectiv serveşte la umflarea particulelor lui şi reprezintă faza staţionară a coloanei de gel. Restul apei, cea „externă" reprezintă faza mobilă. La aplicarea pe o asemenea coloană a unui amestec de substanţe (unele cu

Scanned with OKEN Scanner

molecule mai mici şi altele cu molecule mai mari), cele cu molecule mici difuzează uşor în particulele de gel umflate, în timp ce moleculele mari — datorită dimensiunilor lor — rămîn numai în apa dintre particulele de gel. La eluţie, moleculele mari ies mai repede din coloană, iar cele mai mici ies ulterior. Prin

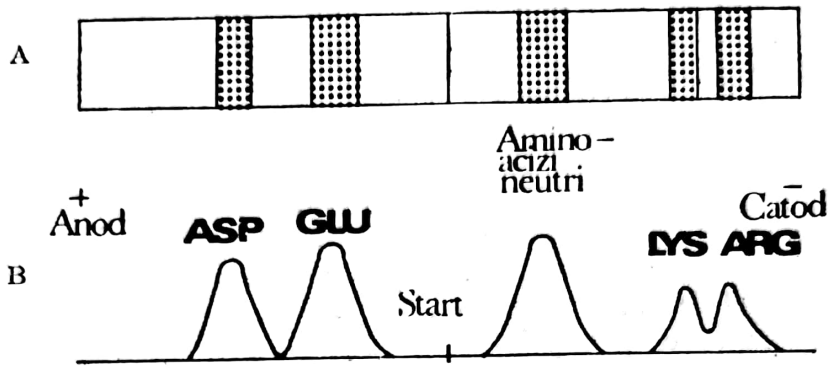


Fig. III.12. Electroforeza pe hîrtie a unui amestec de aminoacizi în tampon cu pH4.

A = deplasarea aminoacizilor sub acţiunea curentului electric în soluţie tampon cu pH4. Benzile sînt colorate cu ninhidrină; B = diagrama curbei obţinută la spectrofotometru fie după eluarea individuală a benzilor colorate, fie prin lectură directă pe întreaga hîrtie de filtru cu ajutorul unui dispozitiv special (densitometru).

urmare, substanţele aplicate pe coloanele cu gel umflat (de dextran sau de poliacrilamidă) sînt eluate de pe aceste coloane în ordinea descrescătoare a greutăţii lor moleculare (fig. III. 11).

Gel-filtrarea reprezintă cea mai importantă metodă modernă utilizată în practica biochimică pentru separări de substanţe.

1.6.6. METODA ELECTROFORETICĂ

Această metodă, numită şi electroforeză sau ionoforeză se bazează pe deplasarea particulelor încărcate electric sub acţiunea unui cîmp electric. Pentru separarea, identificarea şi eventual dozarea aminoacizilor, electroforeza se realizează, fie într-un aparat compartimentat (construit special pentru electroforeză), fie pe un „suport" inert îmbibat cu un anumit lichid. Suportul poate fi gel de amidon, geloză sau hîrtie de filtru iar lichidul este — în general — o soluţie tampon. Folosind o soluţie tampon cu pH 4 şi utilizînd un voltaj mare (cca 70 volţi/cm) se pot obţine prin electroforeză pe hîrtie separări nete pentru toate categoriile de aminoacizi. Într-adevăr, la acest pH aminoacizii monoaminodicarboxilici (acizi) sînt anioni şi deci migrează spre polul pozitiv, aminoacizii diaminomonocarboxilici sînt cationi şi deci migrează la polul negativ iar aminoacizii neutri migrează şi ei spre catod dar mult mai puţin, fiind numai slab încărcaţi pozitiv (fig. III.12).

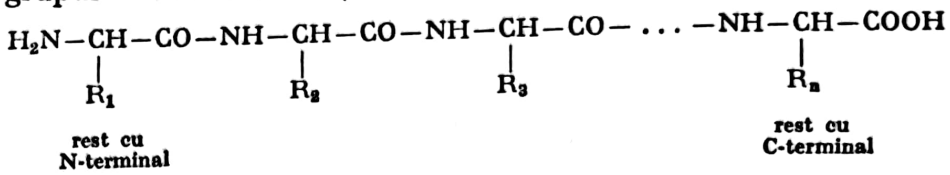
2. PEPTIDELE

Peptidele sînt compuşi rezultaţi prin reunirea aminoacizilor cu eliminarea a cîte o moleculă de apă între carboxilul unui aminoacid şi grupul amino al altui aminoacid. În acest fel ajung să se formeze legături peptidice, —CO—NH—, între aminoacizii înlănţuiţi într-un număr mai mic sau mai mare.

Indiferent de numărul moleculelor de aminoacizi încatenaţi, fiecare lanţ polipeptidic rezultat cuprinde la unul din capete un rest de aminoacid cu

Scanned with OKEN Scanner

grupul $-NH_2$ liber (rest cu N-terminal) iar la celălalt capăt un rest de aminoacid cu grupul $-COOH$ liber (rest cu C-terminal):

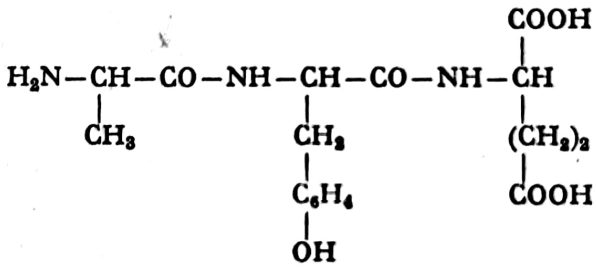


2.1. CLASIFICARE

În unele peptide se găsesc puține resturi de aminoacizi (2, 3 . . . 10); ele se numesc *oligopeptide*. Alte peptide cuprind 10, 20 sau mai multe resturi de aminoacizi; ele se numesc *polipeptide*. La rîndul lor, oligopeptidele se împart în: *dipeptide, tripeptide . . . decapeptide*, după numărul resturilor de aminoacizi (2, 3—10) pe care le cuprind.

2.2. NOMENCLATURĂ

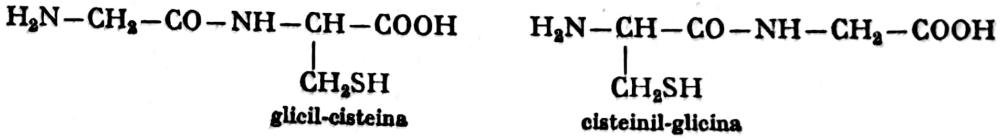
Pentru a numi un peptid se specifică, în ordinea de succesiune — începînd cu restul de aminoacid N-terminal — numele radicalilor aminoacizilor iar la sfîrșit se adaugă numele întreg al aminoacidului care reprezintă restul cu C-terminal. Spre exemplu, tripeptidul:



se numește *alanil-tirozil-glutamic*.

2.3. IZOMERIE

Dipeptidele cuprinzînd aminoacizi distincți se găsesc sub forma a doi izomeri, în funcție de rolul pe care-l îndeplinește fiecare din cei doi aminoacizi constituenți (cu N-terminal sau cu C-terminal). Spre exemplu, dipeptidele formate din glicocol (glicină) și cisteină sînt: glicil-cisteina și cisteinil-glicina:



Pe măsură ce crește numărul aminoacizilor din constituția peptidului, numărul izomerilor teoretici crește foarte mult:

$$N = n! = n(n-1)(n-2) \ldots 3 \times 2 \times 1$$

în care N = nr. izomerilor și n = nr. resturilor de aminoacizi. Spre exemplu, cu 5 aminoacizi diferiți (intrînd o singură dată în constituția peptidului) se pot forma 120 pentapeptide izomere. Într-adevăr, cînd $n = 5$, $N = 5 \times 4 \times 3 \times 2 \times 1 = 120$.

Scanned with OKEN Scanner

2.4. PROPRIETĂŢILE ELECTROCHIMICE ALE PEPTIDELOR

Datorită faptului că fiecare peptid cuprinde pe lîngă aminoacizii terminali (unul cu grup —COOH liber şi celălalt cu grup —NH_2 liber) şi diverşi aminoacizi care conţin în radicalul lor fie —COOH liber (monoaminodicarboxilici), fie —NH_2 liber (diaminomonocarboxilici), peptidele prezintă proprietăţile electrochimice întîlnite la aminoacizi. Ca şi aceştia, fiecare peptid are un punct izoelectric caracteristic (pH_i sau pI) la care nu migrează în cîmp electric şi bineînţeles, la pH-uri mai mari sau mai mici decît punctul izoelectric suferă anaforeză sau cataforeză. Deoarece peptidele au o compoziţie diferită în aminoacizi — deci un component acid sau bazic diferit — ele se pot separa prin cromatografie sau electroforeză, întocmai ca aminoacizii.

2.5. DETERMINAREA CONSTITUŢIEI PEPTIDELOR

Natura aminoacizilor şi proporţiile în care aceştia intră în constituţia peptidelor se determină după hidroliza lor acidă şi analiza hidrolizatelor, prin metode cromatografice sau electroforetice (descrise la aminoacizi).

În cazul în care este nevoie să se determine şi secvenţa aminoacizilor în lanţurile peptidice, prima operaţie constă în cunoaşterea aminoacizilor terminali. În acest scop se pot utiliza diverse metode, bazate în general pe reacţii de culoare.

Pentru determinarea aminoacizilor N-terminali se utilizează frecvent reacţia Sanger sau reacţia Edman, descrise la aminoacizi ca reacţii caracteristice grupului —NH_2. După cuplarea aminoacidului N-terminal sub formă de dinitrofenilaminoacid (reacţia Sanger) sau sub formă de feniltiohidantoină (reacţia Edman), prin hidroliza acidă a peptidului, produsul de cuplare al aminoacidului N-terminal este eliberat şi apoi identificat prin cromatografie (în strat subţire sau pe hîrtie). Este de notat că prin repetarea alternativă a reacţiei Edman cu hidroliza acidă se pot determina secvenţe de foarte mulţi aminoacizi (fig. III.13). Perfecţionînd această metodă, Edman a stabilit — în 1972 — secvenţa celor 162 aminoacizi din constituţia proteinei β-lactoglobulină.

Pentru determinarea aminoacizilor C-terminali din peptide se practică hidrolize enzimatice, folosindu-se carboxipeptidaze care catalizează hidroliza legăturii peptidice vecine unui carboxil liber. Prin urmare, sub acţiunea acestor carboxipeptidaze se detaşează aminoacidul C-terminal şi peptidul îşi scurtează catena cu un rest de aminoacid. Aminoacidul eliberat este identificat ulterior prin cromatografie.

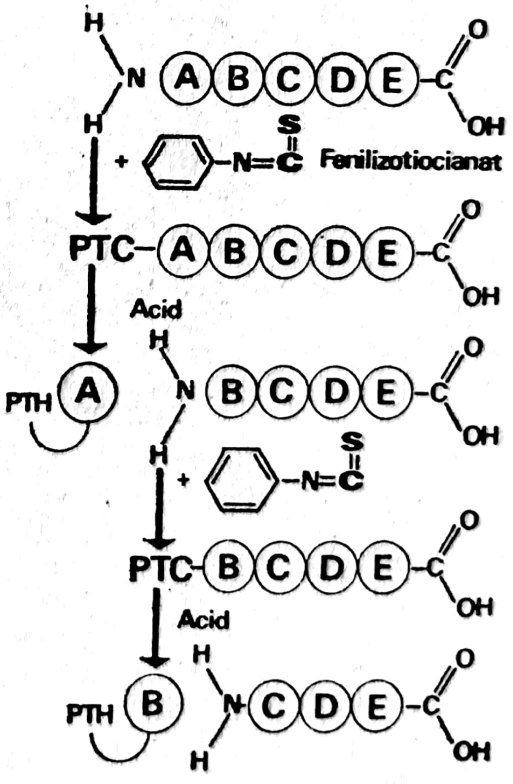


Fig. III.13. Determinarea secvenţei de aminoacizi dintr-un peptid cu ajutorul fenilizotiacianatului (metoda Edman).

Scanned with OKEN Scanner

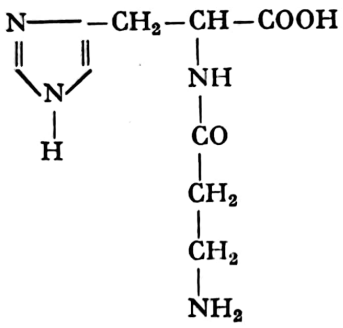
Există două carboxipeptidaze, A și B, de origine pancreatică. Carboxipeptidaza A eliberează toți aminoacizii în afară de: prolină, cisteină și aminoacizii diaminomonocarboxilici (bazici); carboxipeptidaza B eliberează specific lizina și arginina. Asociind acțiunea acestor două carboxipeptidaze și repetînd metoda de hidroliză enzimatică asupra aceluiași peptid, se poate stabili în foarte mare măsură secvența aminoacizilor constituenți.

Trebuie subliniat faptul că repetarea metodelor folosite pentru recunoașterea aminoacizilor terminali ajută la stabilirea, cu ușurință, a secvenței aminoacizilor din peptidele mici. În cazul peptidelor mari se face în prealabil hidroliza catenelor respective și pe fragmentele obținute se aplică ulterior metodele de analiză menționate.

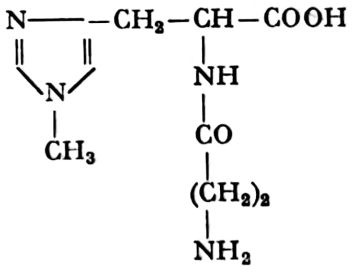
2.6. PEPTIDE NATURALE IMPORTANTE

În constituția mușchilor vertebratelor intră două dipeptide atipice numite carnozină și arsenină. Un alt tripeptid atipic aflat în toate țesuturile organismului, este glutationul care ia parte la procese de oxidoreducție celulară.

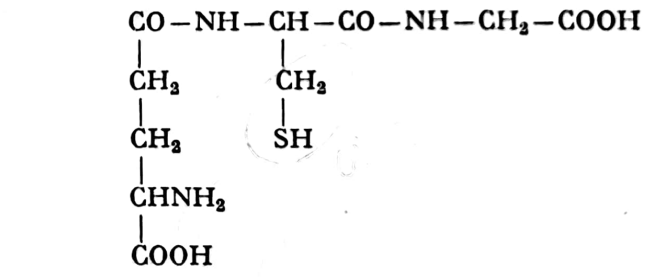
Formulele de constituție ale celor trei peptide atipice menționate sînt:



Carnozina
(β-alanil-histidina)



Anserina
(β-alanil-N_3-metil-histidina)



Glutationul
(γ-glutamil-cisteinil-glicina)

Carnozina și anserina sînt considerate atipice pentru că nu sînt constituite numai din α-aminoacizi; ci, fiecare cuprinde un α-aminoacid și un β-aminoacid. Pe de altă parte, glutationul este socotit atipic pentru că prima din legăturile sale peptidice s-a format prin eliminare de apă între grupul amino al cisteinei și carboxilul cel mai îndepărtat (din poziția γ) al acidului glutamic (nu cel din poziția α).

Prezintă interes biochimic și unele peptide care împlinesc rol de hormoni hipotalamici și/sau hipofizari.

Structura acestora este prezentată în capitolul consacrat hormonilor, specificîndu-se totodată și acțiunea fiecăruia. Alte peptide importante din punct de vedere biochimic au acțiune hipertensivă iar altele intervin în sti-

mularea secreţiei gastrice. Există şi peptide caracteristice participînd la procese inflamatorii. În sfîrşit, prin proteoliza anormală a unor proteine din sînge sau ţesuturi, se formează în organism polipeptide aberante. Dintre categoriile de peptide suscitate exemplificăm cîteva.

Ca hipertensiv acţionează polipeptidul numit *angiotensina I* (care se numea în trecut *hipertensina* sau *angiotonina*). Angiotensina I este pusă în libertate, prin proteoliză, dintr-o α_2-globulină plasmatică sub acţiunea unei enzime din rinichi, numită *renină*.

Din punct de vedere chimic angiotensina I este un decapeptid cu acţiune hipertensivă relativ slabă; cînd este însă transformată în octapeptid, prin îndepărtarea a doi aminoacizi de la capătul C-terminal, îşi intensifică în mod apreciabil activitatea biologică. Octapeptidul se numeşte angiotensină II.

Structurile angiotensinelor I şi II izolate din organismul calului sînt:

Asp—Arg—Val—Tyr—Ile—His—Pro—Phe—His—Leu
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

Angiotensina I

Asp—Arg—Val—Tyr—Ile—His—Pro—Phe

Angiotensina II

În afară de acţiunea hipertensivă, angiotensina are efect şi asupra muşchiului neted, determinînd contracţia lui (efect miotropic). Acest efect îl are şi bradikinina.

Bradikinina se desprinde din fracţiunea globulinică a serului, prin proteoliză sub acţiunea tripsinei. Bradikinina determină contracţia muşchilor netezi şi are efect vasodilatator. Din punct de vedere chimic ea este un nonapeptid, cu constituţia:

Arg—Pro—Pro—Gly—Phe—Ser—Pro—Phe—Arg.

La stimularea secreţiei acidului clorhidric din stomac participă *gastrinele* (I şi II). Acestea sînt două heptadecapeptidamide. Secvenţa celor 17 aminoacizi constitutivi ai gastrinei I din organismul omului este:

Glu-Gly-Pro-Trp-Leu-Glu-Glu-Glu-Glu-Glu-Ala-Tyr-Gly-Trp-Met-Asp-Phe-NH_2

Gastrina I se deosebeşte de gastrina II prin faptul că aceasta din urmă are oxidrilul fenolic al tirozinei esterificat cu acid sulfuric.

Secreţia alcalină (de bicarbonat) a pancreasului este controlată tot de un peptid numit secretină alcătuit din 27 aminoacizi. În cursul procesului inflamator acţionează unele polipeptide a căror constituţie chimică nu este încă bine cunoscută dar a căror activitate este certă. Dintre aceste polipeptide mai importante sînt: *pirexina* care intervine în determinismul reacţiei febrile; *factorul stimulant al leucocitelor* care determină creşterea numărului de leucocite din sînge; *leucotoxina* şi *exudina* care determină creşterea permeabilităţii capilare.

Polipeptide aberante apar sub acţiunea proteolitică a *plasmei* (enzima plasmatică ce lizează cheagul) asupra proteinelor serice. Aceste polipeptide aberante se caracterizează prin capacitatea lor de a digera gelatina.

3. PROTEINELE

După cum s-a precizat la începutul acestui capitol, proteinele sînt substanţe macromoleculare azotate cu roluri structurale şi funcţionale foarte importante în toate organismele animale şi vegetale. Deşi multiple şi com-

Scanned with OKEN Scanner

plexe din punct de vedere structural, proteinele sînt constituite dintr-un număr redus de elemente, aflate — fiecare — într-o proporţie bine determinată.

3.1. COMPOZIŢIA ELEMENTARĂ A PROTEINELOR

Carbon	52,5 %	Azot	16 %
Hidrogen	6,9 %	Sulf	1,35 %
Oxigen	21,5 %	Fosfor	0,1 %

Unele proteine mai cuprind: fier, zinc sau cupru. Deoarece conţinutul în azot al proteinelor este foarte constant (16% N) ori de cîte ori se cere a se face trecerea de la procentul în azot la procentul în proteine, se înmulţeşte conţinutul în azot cu 6,25 (căci — potrivit procentului — 16 este a 6,25-a parte din 100). Deci, proteine % = 6,25 N.

3.2. PROPRIETĂŢILE FIZICE ALE PROTEINELOR

3.2.1. STAREA DE AGREGARE ŞI STABILITATEA

Proteinele sînt substanţe solide, incolore, stabile la temperatura obişnuită. La temperatură uşor ridicată (50°—60°) proteinele se denaturează. (A se vedea mai departe.) Unele proteine pot fi obţinute în stare cristalină; altele numai sub formă de precipitate amorfe.

3.2.2. SOLUBILITATEA

Proteinele se deosebesc unele de altele prin caracterele lor de solubilitate. Astfel, unele proteine sînt solubile în apă pură, altele în soluţii saline diluate, iar altele în soluţii acide sau bazice diluate. Există o categorie de proteine solubile în soluţii alcoolice, însă în alţi solvenţi ai grăsimilor (eter, cloroform, benzen) nu se dizolvă nici o proteină. În sfîrşit, există o categorie de proteine care nu sînt solubile — fără descompunere — în nici un fel de solvent. Acestea intră în constituţia ţesuturilor de protecţie sau de susţinere din organism.

3.2.3. PRECIPITAREA

Proteinele sînt precipitate relativ uşor din soluţiile lor apoase de către sărurile neutre ale unor metale (alcaline sau alcalinopămîntoase) şi de sărurile ionului amoniu.

Este interesant faptul că o aceeaşi sare — în funcţie de concentraţia sa în apă — poate acţiona în două moduri opuse asupra solubilităţii unei proteine. Astfel, la concentraţii mici sarea poate fi un agent dizolvant, determinînd mărirea solubilităţii proteinei, iar la concentraţii mari poate avea efect salificant micşorînd solubilitatea (fig. III.14). De fapt, solubilitatea diferită a unei proteine într-o soluţie salină depinde de forţa ionică molară a soluţiei.

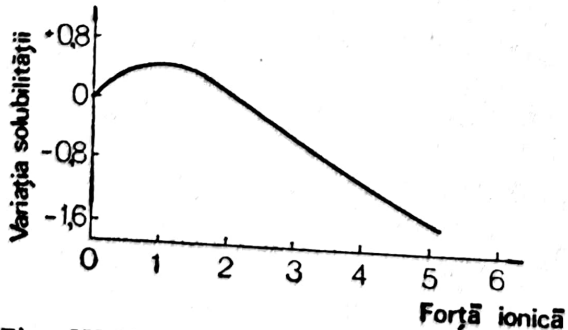


Fig. III.14. Efectul dizolvant şi efectul salificant al sărurilor asupra proteinelor.

Forţa ionică a unei sări este egală cu semisuma concentraţiei fiecărui ion multiplicată cu pătratul valenţei acestui ion. Deci:

$$\mu = \frac{1}{2} \Sigma c z^2$$

în care:

c = concentraţia fiecărui ion şi
z = electrovalenţa fiecărui ion.

La valori mici ale forţei ionice, ionii favorizează solubilitatea stabilizînd sau neutralizînd grupele încărcate electric din proteină; la valori mari ale forţei ionice, fenomenul este contrar: ionii tind să precipite proteine. În acest caz are loc o veritabilă competiţie între proteină şi ioni pentru moleculele apei; ionii răpesc moleculelor de proteină apa care le solvatează. Acest fenomen este cunoscut sub numele de salificare (aussalzen, salting out). Multe proteine dizolvate floculează sau dau naştere la geluri (coagulează) cînd soluţiile lor sînt încălzite la temperaturi de 60—70°.

3.3. ELECTROCHIMIA PROTEINELOR

În fiecare moleculă de proteină există numeroase grupe $-NH_2$ şi $-COOH$ libere. Acestea sînt în primul rînd grupări terminale (α-amino şi α-carboxilice libere) şi în al doilea rînd grupări din radicalii aminoacizilor monoaminodicarboxilici (acid aspartic, acid glutamic) şi diaminomonocarboxilici (lizină, arginină, histidină). Grupările terminale sînt puţine (două pentru fiecare lanţ polipeptidic), însă cele din radicalii aminoacizilor sînt mult mai numeroase.

Grupările $-NH_2$ şi $-COOH$ pot fi ionizate sau neionizate, depinzînd de pH-ul mediului în care se află proteina. În general, într-un domeniu larg de pH sînt ionizate, în fiecare moleculă, numeroase grupări $-COOH$ şi $-NH_2$. Prin urmare, moleculele proteice sînt amfioni ca şi moleculele aminoacizilor. Însă ele sînt mai rar amfioni cu sarcină netă zero, de cele mai multe ori purtînd un exces de sarcină (+) sau (—).

Ionizarea proteinelor (+) sau (—) depinde de pH-ul mediului. Astfel, la pH puternic acid (0—1) toate grupările (COO^- şi NH_2) acceptă protoni, sînt deci *protonate.* Deci sînt refăcute grupările carboxilice şi sînt ionizate toate grupările $-NH_2$ devenind $-NH_3^+$; moleculele proteinei sînt *cationi.* La pH puternic bazic (13—14) toate grupările cedează protoni. Deci sînt refăcute grupările $-NH_2$ şi sînt ionizate toate grupările $-COOH$ (devenite $-COO^-$). Toate moleculele proteinei sînt deci *anioni.* În celelalte regiuni de pH situaţia este intermediară între cele două extreme. Într-adevăr, dacă se consideră că proteina se află în soluţie cu pH = 1 (adică în soluţie acidă 0,1 N şi toate grupările ei sînt protonate) şi se titrează cu soluţie de NaOH, pH-ul soluţiei creşte pe măsură ce scade numărul protonilor fixaţi pe proteină. Grupările $-NH_3^+$ şi $-COOH$ ale proteinei cedează în această situaţie protoni. Cedarea se face în ordinea tăriei aciditătii lor: mai întîi grupele cele mai acide (cu K_a mai mare) şi apoi cele mai puţin acide (cu K_a mai mic); adică în ordinea *crescîndă* a valorilor pK_a. (Cu cît gruparea acidă este mai tare, cu atît pK_a-ul corespunzător este mai mic).

Este uşor de înţeles că în timpul adăugării soluţiei alcaline se ajunge la un moment dat ca proteina (în ansamblu) să elibereze protoni în măsură

Scanned with OKEN Scanner

egală cu cea cu care i-ar fi fixat pe grupele sale $-COO^-$ libere la adăugire de acid. În această situație, moleculele proteinei nu mai acceptă protoni din mediu și nici nu mai cedează protoni mediului. Situația este corespunzătoare punctului *zero* de pe axa ordonatelor (fig. III.15). pH-ul corespunzător acestui punct este pentru hemoglobina de cal 6,9. Acest pH este punctul izoelectric al proteinei.

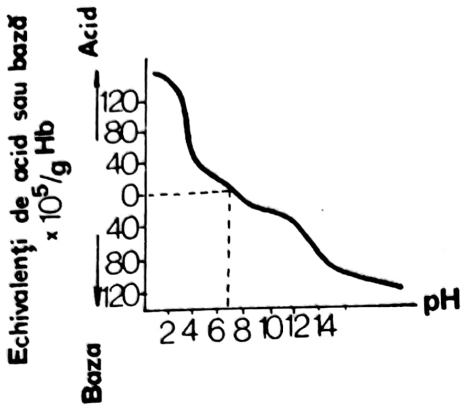


Fig. III.15. Curba de titrare a hemoglobinei de cal.

La punctul izoelectric situația moleculelor proteice este asemănătoare cu cea a moleculelor aminoacizilor aflați la pI; adică sarcina netă a fiecărei molecule este nulă. Deosebirea dintre moleculele aminoacizilor și moleculele proteinelor la pI constă doar în faptul că, în general, moleculele proteinelor nu poartă numai cîte o singură sarcină de fiecare fel ca aminoacizii ci mai multe sarcini pozitive neutralizate — din punct de vedere electric — de tot atîtea sarcini negative.

Din cauza numărului mare de sarcini electrice purtate de moleculele proteice (nu numai la pI ci, în general, la orice pH), proteinele sînt caracterizate — din punct de vedere electrochimic — drept polielectroliți.

Valorile pI ale unor proteine *Tabelul III.4*

Proteina	pI	Proteina	pI
Pepsina	1,0	γ-globulina serică	6,6
Ovalbumina	4,6	Hemoglobina	6,8
Tireoglobulina	4,6	Mioglobina	7,0
Serumalbumina	4,9	Chimotripsinogenul	9,5
Ureaza	5,0	Citocromul c	10,6
Fibrinogenul	5,5	Lizozimul	11,0

pI-ul unei proteine (tabelul III.4) nu se poate calcula cu ajutorul unei formule ca pentru aminoacizi ci se determină experimental.

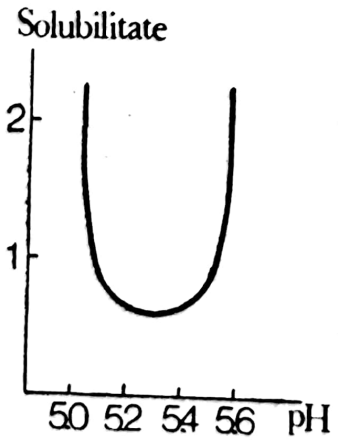


Fig. III.16. Solubilitatea β-lactoglobulinei în funcție de pH.

Importanța cunoașterii valorilor pI. Datorită faptului că la pI stabilitatea proteinelor este minimă (fig. III.16) se obișnuiește a se precipita mai ușor proteinele la pI. După separare la pI se poate proceda la purificarea proteinelor. În acest scop se folosesc diverse procedee de izolare și purificare.

3.3.1. PUNCTUL IZOELECTRIC ȘI PUNCTUL IZOIONIC

pH-ul mediului la care moleculele unei proteine sînt egal ionizate la grupări bazice și acide nu este exact același în soluții care cuprind numai proteina cercetată și în soluții care, pe lîngă proteină, cuprind și săruri minerale. De aceea, pentru

deosebirea situaţiilor, pH-ul soluţiilor pure (fără săruri) este numit *punct izoionic*; iar cel al soluţiilor saline, *punct izoelectric*.

Punctul izoelectric depinde de concentraţia sărurilor în soluţii; el variază însă în mică măsură la concentraţiile obişnuite (mai mici decît 1 M). Valoarea punctului izoelectric în asemenea soluţii este foarte apropiată de cea a punctului izoionic.

3.3.2. ACŢIUNEA TAMPON A PROTEINELOR

Ca şi aminoacizii, proteinele au acţiune (putere) tampon. Aceasta se datoreşte aceloraşi motive: (a) cuprind grupări slab bazice $—NH_2$ iar o grupare $—NH_2$ împreună cu gruparea conjugată NH_3^+ constituie un sistem tampon; (b) cuprind grupări slab acide —COOH iar acestea constituie sisteme tampon cu bazele conjugate $—COO^-$.

S-a arătat la aminoacizi că un aminoacid monoaminomonocarboxilic are putere tampon în două regiuni de pH: (a) una în care soluţia cuprinde simultan în concentraţii apreciabile sistemul amfion şi anion ($—COO^-$) şi (b) alta în care soluţia cuprinde sistemul amfion şi cation ($—NH_3^+$). S-a mai arătat că regiunile acestea depind de valorile pK_{a_1} şi pK_{a_2} (respectiv pentru —COOH şi $—NH_3^+$), măsurate în scara pH-ului.

Deoarece moleculele proteinelor cuprind multe grupe —COOH şi $—NH_2$, cu pK-uri diferite, se deduce că o proteină trebuie să aibă putere tampon în multe regiuni de pH, răspîndite în tot lungul scării. Această deducţie este confirmată de alura curbei de titrare a unei proteine (fig, III.15). Într-adevăr, o asemenea curbă prezintă pe toată lungimea ei o înclinare considerabilă faţă de axa absciselor, ceea ce înseamnă că în orice regiune de pH adăugirea unor cantităţi apreciabile de acid sau de bază (înscrise în ordonate) determină variaţii relativ mici ale pH-ului soluţiei (înscris în abscisă).

3.3.3. IMPORTANŢA FIZIOLOGICĂ A TAMPONĂRII EXERCITATĂ ÎN ORGANISM DE CĂTRE PROTEINE

În sînge (ca de altfel şi în celulele altor ţesuturi) tamponarea este exercitată de către proteine, în cea mai mare măsură. Capacitatea tampon a sîngelui este datorită în măsură de cca 60% hemoglobinei şi de cca 20% proteinelor plasmatice. Datorită lor, valoarea normală a pH-ului sanguin se menţine în jurul valorilor 7,3—7,5. O reducere a acestor valori sub pH 7,3 marchează starea patologică de *acidoză* iar o creştere peste pH 7,5 denotă o altă stare patologică, alcaloză.

3.3.4. POLARITATEA MOLECULELOR PROTEICE

În fiecare moleculă proteică există două centre separate, pentru cele două categorii de sarcini (pozitive şi negative). Deoarece atît numărul sar-

Tabelul III.5

Dipolmomentele unor proteine

Proteina	Dipolmomentul (debye)
Insulina	310
Serumalbumina	380
Oxihemoglobina	480
γ-globulina	1100

Scanned with OKEN Scanner

cinilor pozitive cît şi cel al sarcinilor negative este mai mare iar distanţele dintre centrele de greutate ale sarcinilor sînt apreciabile, moleculele proteice au dipolmomente foarte mari, de sute şi chiar mii de unităţi (aşa cum rezultă din tabelul III.5).

3.4. GREUTĂŢILE MOLECULELOR PROTEICE ŞI DETERMINAREA LOR

Proteinele au greutăţi moleculare caracteristice. Determinarea s-a făcut în trecut mai cu seamă prin unele metode fizico-chimice bazate pe: (1) punctul de îngheţare (crioscopie) sau (2) presiunea osmotică. Aceste metode nu au dat însă rezultate precise din multiple cauze: pH-ul mediului, prezenţa electroliţilor, gradul de hidratare al proteinelor etc. În timpul din urmă, greutăţile moleculare ale proteinelor au ajuns să fie determinate cu mare precizie prin metoda introdusă de Svedberg şi bazată pe viteza de sedimentare a moleculelor proteice în timpul ultracentrifugării.

3.4.1. PRINCIPIUL METODEI ULTRACENTRIFUGĂRII ANALITICE

Moleculele proteinelor sînt suficient de mari pentru a sedimenta cînd soluţiile care le cuprind se centrifughează la turaţii ridicate (60 000 ture / minut) în ultracentrifuge. Sedimentarea proteinelor în cursul ultracentrifugării poate fi urmărită cu ajutorul unui sistem optic adecvat datorită faptului că indicele de refracţie suferă variaţii în funcţie de schimbarea concentraţiei soluţiei proteice (fig. III.17 şi 18). După cum se poate observa în fig. III.17, în partea stîngă s-a reprezentat componentul cu moleculele mai uşoare (s) şi în partea dreaptă componentul cu molecule mai grele (S). Pentru proteina mai uşoară, între A şi B există un gradient de concentraţie iar între B şi D concentraţia este constantă. Pentru proteina mai grea se poate admite

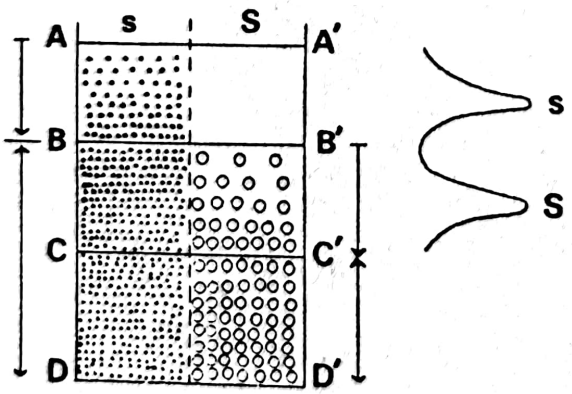


Fig. III.17. Schema sedimentării unui amestec de două proteine pure cu mase moleculare foarte diferite.

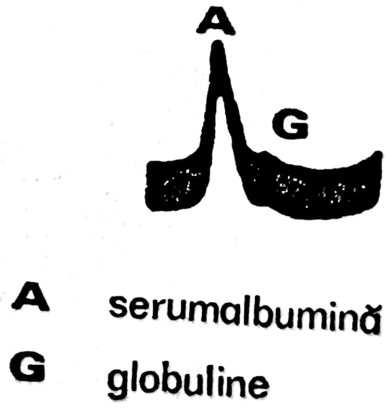


Fig. III.18. Diagrama ultracentrifugării unui ser uman normal.

că nu sînt molecule între A şi B; există însă un gradient de concentraţie între B şi C iar între C şi D concentraţia este constantă. Prin urmare, între A şi B gradientul de concentraţie este datorat numai proteinei uşoare iar între B şi C numai proteinei grele. Dispozitivul optic traduce aceşti doi gradienţi prin două „vîrfuri" *s* şi *S* care corespund celor doi constituenţi ai amestecului proteic. Se admite că dacă masele sau greutăţile moleculare ale celor două proteine — deci şi vitezele lor de sedimentare — sînt mai apropiate,

Scanned with OKEN Scanner

cele două vîrfuri se suprapun parțial iar dacă greutățile moleculare sînt foarte apropiate nu se observă decît un singur vîrf și deci separarea prin ultracentrifugare nu este posibilă.

Un calcul relativ simplu permite să se cunoască masa moleculară a unei proteine cînd se determină viteza de sedimentare în cursul ultracentrifugării efectuată în anumite condiții, riguros respectate.

Fiecare proteină se caracterizează printr-o *constantă de sedimentare*:

$$S = \frac{dx/dt}{w^2 x}$$

în care:

x = distanța între axa de rotație și punctul urmărit în lichid;
t = timpul,
w = viteza unghiulară de rotație.

Constantele de sedimentare sînt cuprinse între 10^{-13} secunde și 200×10^{-13} secunde, în funcție de proteinele studiate. Svedberg a propus să se considere drept unitate valoarea 10^{-13} (unitate Svedberg, notată cu S). Prin urmare, constantele de sedimentare sînt cuprinse între 1 și 200 S (la temperatura de +20°C).

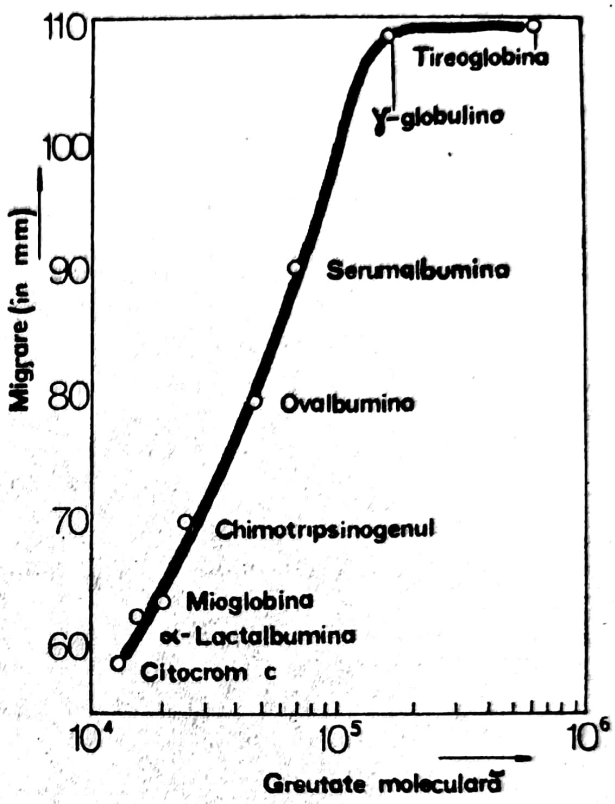


Fig. III.19. Cromatografia în strat subțire de gel folosită pentru determinarea greutății moleculare a proteinelor.

Între masa moleculară (M) a unei proteine și constanta sa de sedimentare (S) se află relația:

$$M = \frac{R\,T\,S}{D(1+\hat{V}\rho)}$$

în care:

R = constanta gazelor;
T = temperatura absolută;
D = constanta de difuzie a proteinei;
ρ = densitatea lichidului și
V = volumul specific parțial (creșterea de volum care are loc cînd 1 g de proteină este adăugată la un volum mare de solvent). Deci M depinde de D. Determinarea lui D se face în experiențe paralele de difuzie efectuate pe un lichid identic cu cel utilizat în experiențele de ultracentrifugare.

Greutatea moleculară a proteinelor se mai poate determina și prin cromatografie în strat subțire pe gel de dextran. După cum se observă în fig. III.19, există o corelație directă, lineară între greutatea moleculară a unei proteine și viteza sa de migrare în gel.

Scanned with OKEN Scanner

Pentru unele proteine ale căror greutăţi moleculare s-au determinat prin metodele menţionate, s-au găsit valorile din tabelul III.6.

Se ştie că prin hidroliză (acidă, bazică sau enzimatică) proteinele eliberează aminoacizii constitutivi. Ţinînd seama că greutatea moleculară medie

Tabelul III.6

Greutăţile moleculare ale unor proteine

Proteina	Greutatea moleculară
insulina (bovină)	5 733
ribonucleaza (pancreas bovin)	12 640
lactalbumina	15 500
mioglobina (inimă de cal)	16 890
hemoglobina (umană)	64 500
hexokinaza	96 000
catalaza	250 000
fibrinogenul (sînge bovin)	330 000
glutamat-dehidrogenaza (ficat bovin)	336 000
tireoglobulina	669 000
proteina virusului poliomielitei	5 500 000
proteina virusului mozaicului tutunului	40 000 000

a aminoacizilor este cca 120 iar greutăţile moleculare ale proteinelor sînt de ordinul celor menţionate în tabelul III.6, se poate conchide că, în general, moleculele unei proteine cuprind de la cîteva sute pînă la cîteva zeci de mii de resturi de aminoacizi.

3.5. STRUCTURA PROTEINELOR

Din unirea unui număr mare (cîteva sute) sau foarte mare (cîteva zeci de mii) de aminoacizi, rezultă lanţurile polipeptidice din constituţia proteinelor. Aceste lanţuri diferă unele de altele sub raportul lungimii, naturii şi secvenţei aminoacizilor constitutivi. În special, din acest ultim punct de vedere rezultă un număr foarte variat de lanţuri prin diverse combinaţii ale secvenţei. Spre exemplu, cu 10 aminoacizi intrînd o singură dată în lanţ pot exista 3 628 800 lanţuri izomere. Ţinîndu-se seama şi de celelalte două criterii de diferenţiere a lanţurilor polipeptidice, se înţelege că proteinele rezultate sînt foarte variate, prezentînd multiplii izomeri. În realitate se constată că în natură se întîlnesc numai anumite proteine, destul de numeroase, dar totdeauna aceleaşi. Acest fapt arată că în natură se sintetizează molecule proteice care cuprind în lanţurile polipeptidice constituente anumite secvenţe de aminoacizi. Proteinele astfel sintetizate prezintă o anumită specificitate (de ţesut, de organ etc.) dirijată de acizii nucleici care au participat la biosinteză (aşa cum se va arăta în capitolul următor).

În general, în constituţia unei proteine nu intră un singur lanţ polipeptidic ci mai multe iar acestea nu sînt desfăşurate în lungime ci răsucite sau cu catena polipeptidică dispusă în zig-zag, în mai multe planuri. Pe de altă parte, datorită diverselor grupe funcţionale libere din radicalii aminoacizilor (OH, $-NH_2$, $-COOH$, $-SH$), lanţurile se pot consolida prin stabilire de legături intra-catenare (din cuprinsul aceluiaşi lanţ) şi inter-catenare (dintre

Scanned with OKEN Scanner

lanţuri). Ţinîndu-se seama de toate acestea, se înţelege imediat că datorită lanţurilor polipeptidice constituente, la moleculele proteice se întîlneşte o anumită organizare specială, care a fost pusă în evidenţă prin analiză roentgenografică.

Organizarea moleculelor proteice constă în 4 categorii de structuri (sau niveluri de organizare): structura primară, structura secundară, structura terţiară şi structura quaternară.

3.5.1. STRUCTURA PRIMARĂ

Structura primară a unei proteine este dată de structura chimică a fiecărui lanţ polipeptidic (adică de felul şi secvenţa aminoacizilor cuprinşi în lanţ) şi de numărul lanţurilor. La baza sa stau legăturile peptidice care leagă aminoacizii între ei. Dar acestea nu sînt singurele legături existente. Într-adevăr, dacă proteina este formată dintr-un singur lanţ polipeptidic şi în cuprinsul lui se găsesc mai multe resturi de cisteină, ele se pot uni două cîte două prin pierderea de hidrogen din grupările —SH, stabilind astfel cîte o punte disulfurică. Aceste punţi disulfurice provoacă distorsiuni ale catenelor polipeptidice. În fig. III.20 se prezintă structura primară a ribonucleazei

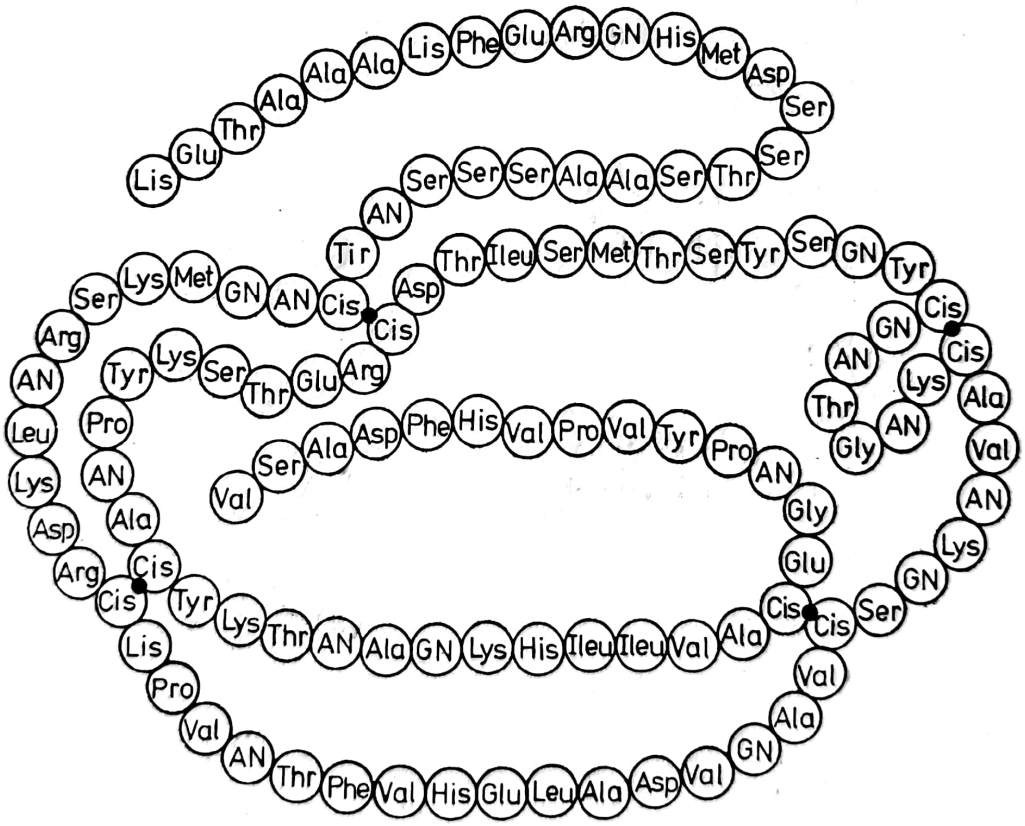


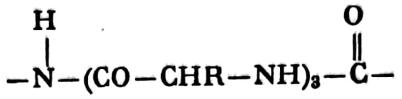
Fig. III.20. Structura primară a ribonucleazei.

care cuprinde un singur lanţ polipeptidic format din 124 resturi de aminoacizi dintre care 8 sînt resturi de cisteină angajate în 4 legături disulfurice.

Punţile disulfurice se pot stabili şi între resturi de cisteină aparţinînd unor catene diferite. Această situaţie se întîlneşte în structura insulinei. (A se vedea la capitolul „Hormoni").

Scanned with OKEN Scanner

Structura secundară corespunde organizării lanţurilor. Cu ajutorul difracţiei razelor X de către proteine (în stare cristalină sau fibrilară), s-au putut măsura distanţele dintre atomi şi unghiurile dintre valenţe, punîndu-se în evidenţă diverse structuri spaţiale ale catenelor polipeptidice. S-a constatat astfel (Pauling şi Corey) că lanţurile pot fi răsucite în spirală (sau helix) sau dispuse în „foaie pliantă" numită şi structură β. În cazul cel mai general, lanţurile sînt spiralate formînd un *α-helix* cu caractere bine determinate. În cazul unui α-helix, fiecare grup —NH dintr-un rest de aminoacid este legat printr-o punte de hidrogen cu grupul >C=O de al 4-lea rest de aminoacid care-i urmează în secvenţă pe spirală. Prin urmare, unitatea repetitivă a unui α-helix este:



Pasul elicei cuprinde 3,6 resturi de aminoacizi şi fiecare rest contribuie la avansarea helicei — pe verticală — cu 1,47 Å; ceea ce determină o înălţime — în linie dreaptă — a pasului helicei de 5,4 Å (fig. III.21 şi III.22).

Legăturile de hidrogen pot fi intracatenare şi intercatenare, după cum se remarcă în cazul dispunerii a două lanţuri „în foaie pliantă" (fig. III.23).

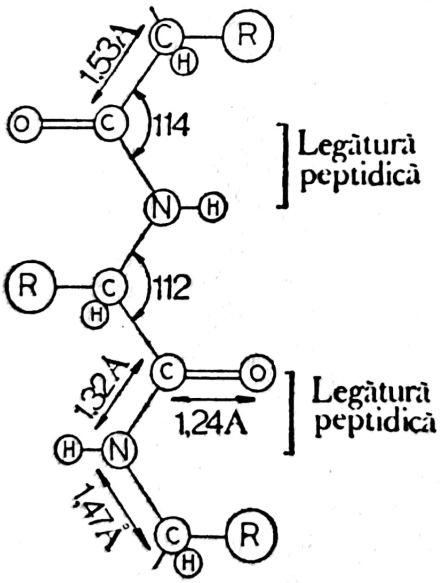


Fig. III.21. Distanţele dintre atomi şi unghiurile dintre valenţe la aminoacizii unei catene polipeptidice.

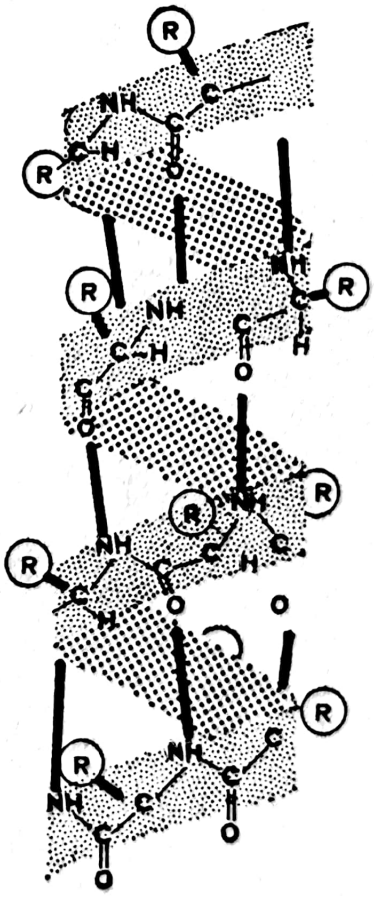


Fig. III.22. O catenă polipeptidică cu structură α-helicoidală.

Pe de altă parte, datorită aşezării în acelaşi lanţ a două resturi de aminoacizi avînd în radicalii respectivi grupări funcţionale capabile să reacţioneze între ele, se stabilesc şi altfel de legături intracatenare. Ansamblul caracte-

Scanned with OKEN Scanner

relor citate: felul helixului sau aspectul de „foaie pliantă" a lanţului polipeptidic, modurile de stabilizare a helixurilor prin legături intracatenare între aminoacizii din cuprinsul aceluiaşi lanţ, constituie ceea ce se numeşte structura secundară a proteinelor.

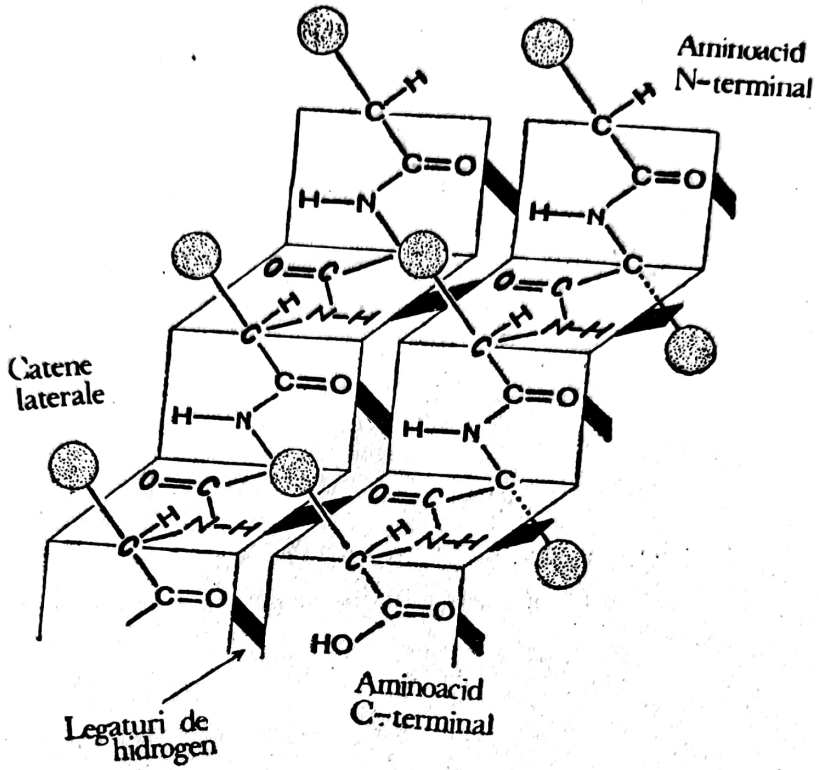
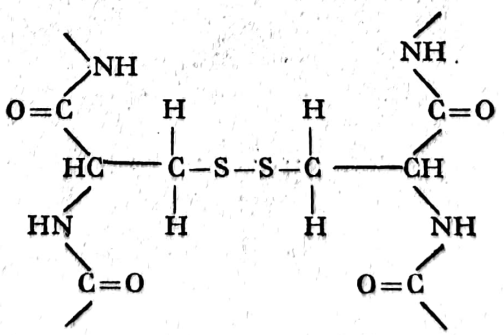


Fig. III.23. Aşezarea în foaie pliantă sau structură β, a două catene polipeptidice.

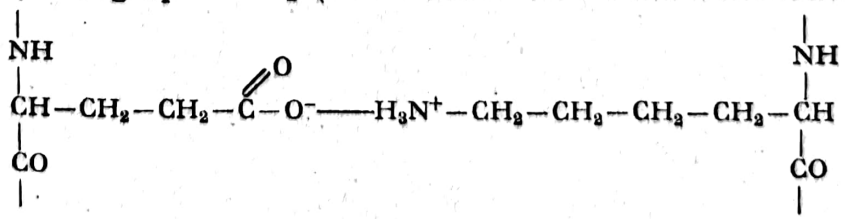
3.5.3. STRUCTURA TERŢIARĂ

Structura terţiară a proteinelor corespunde modului în care lanţurile sînt legate între ele, deci naturii legăturilor intercatenare. Legăturile dintre lanţurile polipeptidice pot fi:

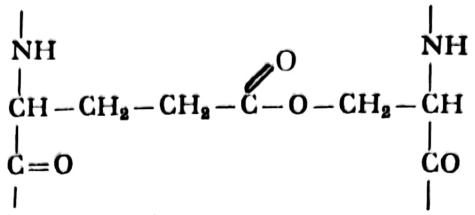
a) legătură disulfurică, —S—S—, între două resturi de cisteină;



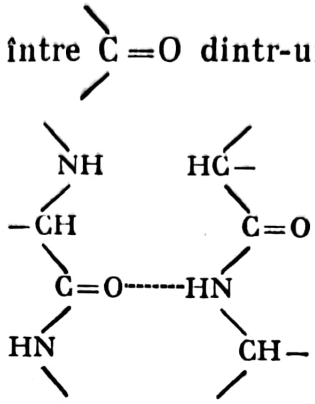
b) legătură salină între un grup —COOH (dintr-un aminoacid monoaminodicarboxilic) şi un grup $-NH_2$ (dintr-un aminoacid diaminomonocarboxilic):



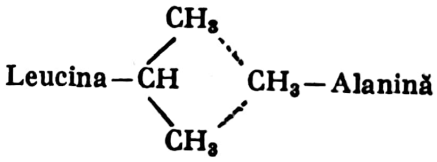
c) legătură esterică între un grup —COOH (din acid glutamic sau aspartic) și un grup —OH alcoolic (din serină, spre exemplu):



d) legături de hidrogen între $C=O$ dintr-un lanț și NH din alt lanț:



e) legături prin forțe Van der Waals între grupe nepolare; spre exemplu, între gruparea $-CH_3$ a alaninei și metilii grupării izopropil din valină sau leucină:



Deși slabe, aceste ultime două genuri de legături (de hidrogen și prin forțe Van der Waals) sînt foarte numeroase; de aceea ele contribuie, într-o mare măsură, la consolidarea lanțurilor și la imprimarea structurii terțiare a proteinelor.

Pe de altă parte, cînd moleculele proteice sînt constituite dintr-un lanț unic, acesta poate fi „îmbobinat" într-un anume fel, iar cînd cuprinde mai multe lanțuri helicoidale, acestea pot fi „răsucite" împreună și consolidate prin legături intercatenare. Modurile de îmbobinare, înfășurare sau răsucire ale lanțurilor polipeptidice constituie și ele elemente caracteristice structurii terțiare (alături de natura legăturilor intercatenare) (fig. III.24 și fig. III.25).

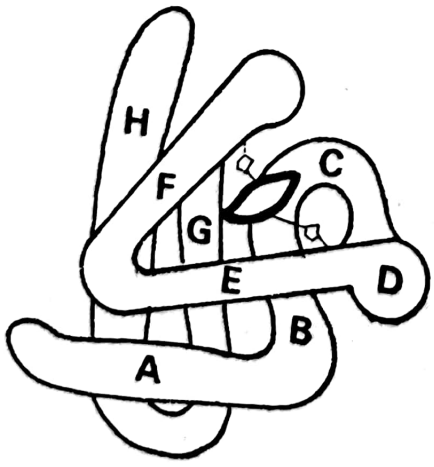


Fig. III.24. Reprezentarea schematică a structurii tridimensionale a unei catene polipeptidice de hemoglobină.

3.5.4. STRUCTURA CUATERNARĂ

Mai multe molecule ale aceleiași proteine — posedînd cele trei genuri de structuri menționate — se pot asocia rezultînd o unitate de sine stătătoare cu o formă bine determinată. În această situație, subunitățile sînt ținute împreună prin forțe Van der Waals, legături de hidrogen și, în mai mică măsură, prin

Scanned with OKEN Scanner

legături saline. Această relaţie caracterizată prin modul în care se unesc catenele polipeptidice individuale între subunităţile unei entităţi proteice constituie structura cuaternară a proteinelor. O asemenea structură se

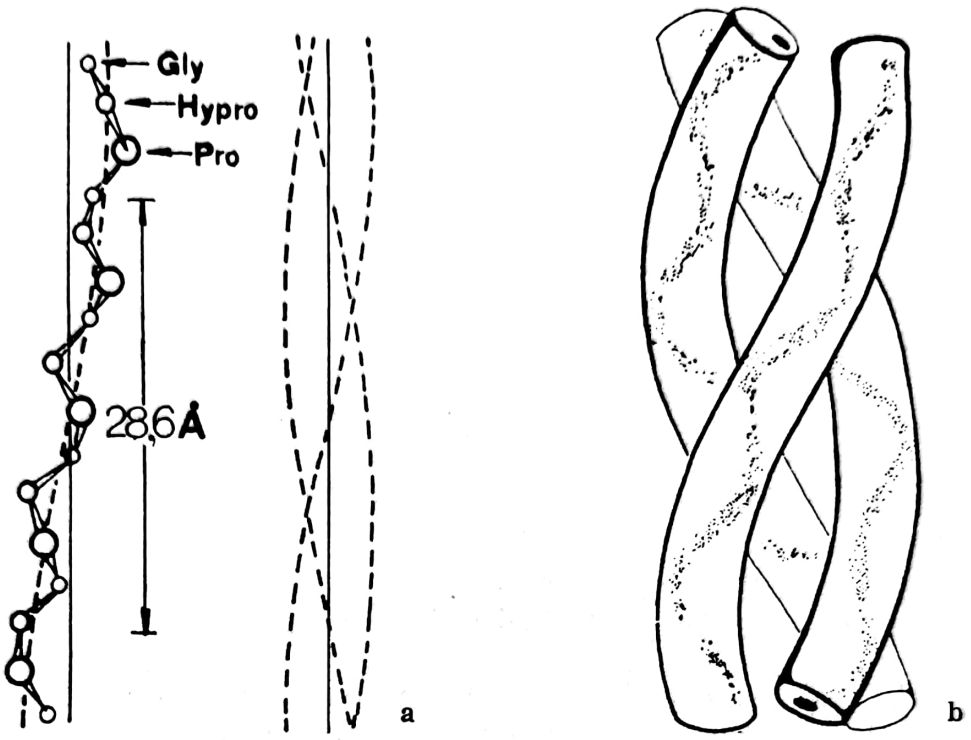


Fig. III.25. Structura colagenului:
a — reprezentarea schematică; b — reprezentarea tridimensională.

întîlneşte, spre exemplu, la hemoglobină care este un tetramer constituit din doi monomeri cu lanţ polipeptidic α şi alţi doi monomeri cu lanţ polipeptidic β (fig. III.26). Fiecare lanţ (α sau β) posedă cele trei feluri de struc-

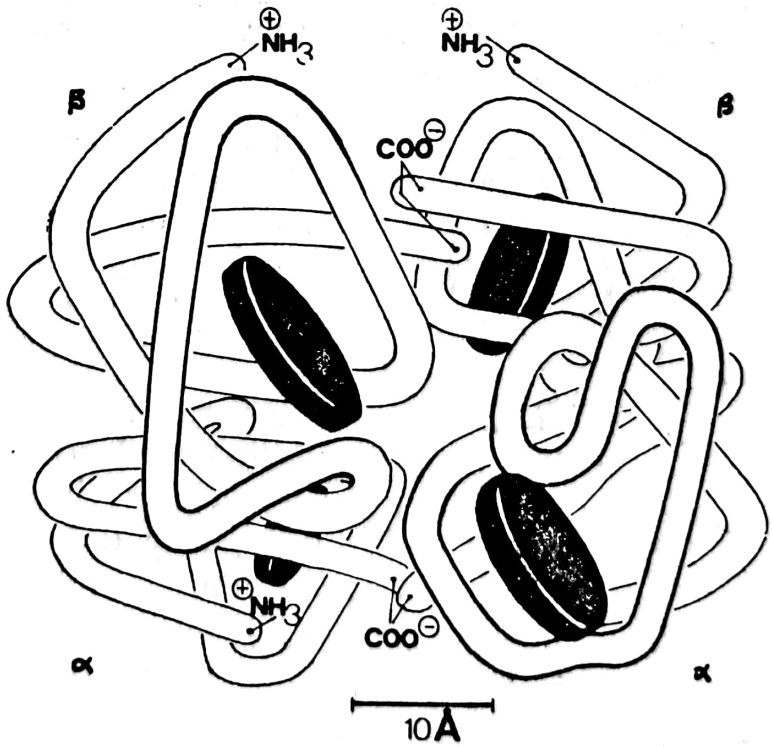


Fig. III.26. Tetramerul hemoglobinei.

Scanned with OKEN Scanner

turi menţionate. Între lanţurile de acelaşi fel se găsesc legături saline stabilite între grupări polare iar între lanţurile deosebite se află legături de hidrogen sau forţe Van der Waals. Datorită tuturor acestor legături, tetramerul are o stabilitate deosebită.

3.6. DENATURAREA PROTEINELOR

Acest fenomen este specific proteinelor, constînd în schimbarea proprietăţilor fizico-chimice şi biologice, sub influenţa unor factori numiţi agenţi denaturanţi.

Proprietăţile fizico-chimice modificate prin denaturare sînt: (a) solubilitatea (prin denaturare proteinele floculează sau coagulează); (b) capacitatea de a cristaliza se pierde; (c) capacitatea de a rezista la hidroliză scade; (d) capacitatea de a da reacţii de culoare se accentuează.

Proprietăţile biologice modificate prin denaturare se manifestă atît la hormonii de natură proteică şi la enzime, care îşi pierd activitatea de biocatalizatori, cît şi la anticorpi sau antigeni care-şi pierd specificitatea imunochimică.

3.6.1. AGENŢII DENATURANŢI

Temperatura (60—70°), acizii şi bazele concentrate, unii solvenţi organici de felul alcoolului şi eterului, detergenţii, ureea, unii agenţi mecanici (agitare, ultrasunete), razele Röntgen, razele ultraviolete sînt agenţi denaturanţi.

3.6.2. CELE DOUĂ TIPURI DE DENATURĂRI

Unii agenţi determină denaturarea numai cît timp îşi exercită acţiunea asupra proteinelor. Această denaturare este reversibilă; proteina îşi recapătă toate proprietăţile cînd agentul denaturant a fost îndepărtat. Spre exemplu: printr-un adaos mare de clorură de sodiu la o soluţie de ovalbumină (albuş de ou) proteina floculează; prin diluarea cu apă proteina se redizolvă iar soluţia îşi reia aspectul iniţial (fig. III.27).

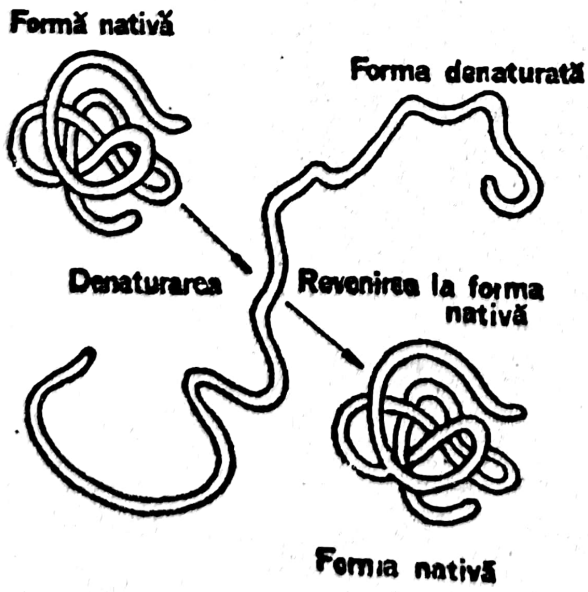


Fig. III.27. Denaturarea reversibilă a unei proteine.

Cînd denaturarea provocată de un agent denaturant persistă şi după încetarea acţiunii acestuia, procesul este ireversibil. Spre exemplu, prin încălzirea (la 60—70°) a unei soluţii de ovalbumină, proteina se prinde în masă prin coagulare (luînd aspectul cunoscut al albuşului întărit prin fierbere).

Ce modificări structurale suferă proteina în cursul denaturării?

S-a stabilit că în denaturarea reversibilă se rup numai legături de hidro-

Scanned with OKEN Scanner

gen şi Van der Waals. În cazul denaturării ireversibile se rup legături chimice propriu-zise; în special, legături disulfurice inter- şi intra-catenare. Legăturile de hidrogen sau Van der Waals se pot reface după îndepărtarea agentului denaturant, legăturile chimice însă nu se mai restabilesc. Faptul că prin cele două categorii de denaturări se rup legăturile care consolidează structurile secundară şi terţiară ale moleculelor proteice, dovedeşte că denaturarea alterează aceste două feluri de structuri proteice. Pe de altă parte, s-a menţionat că denaturarea alterează însuşirile biologice ale proteinelor. Aceasta arată că proprietăţile biologice ale proteinelor depind şi de structurile secundară şi terţiară ale respectivelor molecule, nu numai de structura primară (felurile lanţurilor polipeptidice).

3.7. PROPRIETĂŢILE ANTIGENICE ALE PROTEINELOR

Alături de denaturare proteinele mai prezintă o categorie de proprietăţi specifice lor, proprietăţile antigenice. Despre acestea se poate da seama luîndu-se în considerare următoarele fapte:

Dacă se injectează la un animal o proteină provenind din organismul unei alte specii, în sîngele animalului la care s-a injectat proteina, apar substanţe proteice care se combină cu ea, împiedicînd circulaţia în organism a proteinei injectate. Substanţa injectată se numeşte *antigen* iar cea produsă în organismul animalului la care s-a injectat se numeşte *anticorp*; el precipită antigenul. Reacţia organismului căruia i s-a injectat antigenul şi care a condus la producerea de anticorpi se numeşte reacţie de imunitate. Prin asemenea reacţii organismele vii se apără împotriva microbilor sau virusurilor; ele explică de ce anumite boli microbiene sau virale nu pot apare decît o singură dată la un acelaşi individ.

Reacţiile de imunitate permit — totodată — şi diferenţierea proteinelor diferite între ele. Într-adevăr, anticorpii produşi în urma injecţiei unui anume antigen îl precipită numai pe acesta. De aceea, pentru recunoaşterea antigenului şi deosebirea lui de altă proteină se pot folosi anticorpii respectivi ca cei mai specifici reactivi. Ei sînt utilizaţi curent în metodele de analiză imunologică.

Regiunea din molecula proteinei antigen care formează complexul cu anticorpul se numeşte *determinant antigenic*. Determinanţii antigenici se combină în anumite locuri (situsuri specifice) cu anticorpii. În general, există cel puţin două situsuri identice la fiecare moleculă de anticorp (fig. III.28).

Asocierea antigen-anticorp se realizează prin legături slabe, nespecifice; singurul fapt decisiv în specificitatea reacţiei de imunitate este complementaritatea formei moleculelor implicate în proces.

Este de remarcat că atunci cînd nu rezultă precipitate în reacţia antigenului cu anticorpul, reacţia de imunitate este reversibilă. Cînd se

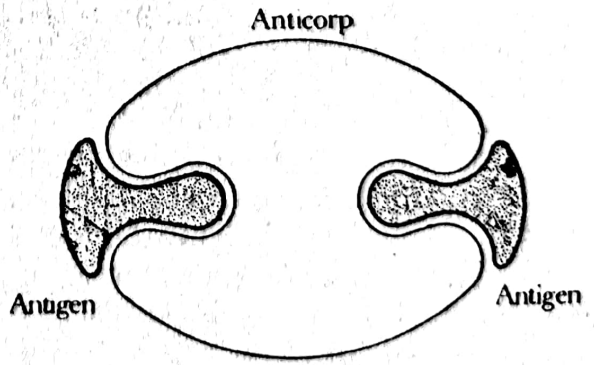


Fig. III.28. Un anticorp cu două situsuri de fixare a antigenului.

Scanned with OKEN Scanner

formează precipitate, desocierea complexelor antigen-anticorp este foarte anevoioasă şi de aceea, în asemenea cazuri, reacţiile de imunitate sînt considerate ireversibile.

Aplicaţiile metodei de analiză imunologică pentru identificarea unei proteine sau pentru testarea purităţii ei sînt prezentate principial, la sfîrşitul acestui capitol.

3.8. CLASIFICAREA PROTEINELOR

Deoarece proteinele aflate în natură sînt foarte numeroase, s-a impus — de multă vreme — clasificarea lor. În decursul timpului s-au elaborat mai multe clasificări bazate pe diverse criterii. Cea care se va urmări aici se bazează pe proprietăţile generale ale proteinelor: compoziţia chimică, forma moleculelor şi solubilitatea.

Potrivit compoziţiei lor chimice, proteinele se împart în două grupe mari: (1) *proteine simple* care prin hidroliză dau naştere numai la aminoacizi şi (2) *proteine conjugate* care prin hidroliză dau naştere la aminoacizi şi la substanţe de natură deosebită de aminoacizi (numite *grupe prostetice*).

După forma moleculelor, proteinele se împart în (a) *proteine globulare*, cu înfăţişare sferică sau elipsoidală şi (b) *proteine fibrilare* cu molecule mult alungite. În afară de forma moleculelor, aceste două categorii se deosebesc şi prin solubilităţile lor. Proteinele globulare sînt solubile în apă, soluţii saline apoase, acizi, baze, alcool; proteinele fibrilare sînt în general insolubile în oricare din solvenţii menţionaţi. Există totuşi unele proteine cu molecule alungite (deci fibrilare) care sînt solubile în anumiţi solvenţi. Din această ultimă categorie fac parte: fibrinogenul (studiat în capitolul privind biochimia sîngelui) şi două proteine musculare: actina şi miozina (studiate în capitolul privind biochimia ţesutului muscular).

3.8.1. PROTEINELE SIMPLE

În cele ce urmează se trec în revistă principalele subclase de proteine simple întîlnite în organismul animal, aparţinînd categoriei proteinelor globulare şi proteinelor fibrilare (solubile şi insolubile). Sînt prezentate — în primul rînd — caracterele proteinelor globulare. În ordinea greutăţii lor moleculare crescînde, din categoria proteinelor globulare aflate în organismul animal fac parte: protaminele, histonele, albuminele şi globulinele.

3.8.1.1. *Protaminele* sînt proteinele cele mai simple, avînd greutăţi moleculare de cîteva mii (cca 5 000). În constituţia lor intră numai cîţiva aminoacizi diferiţi, predominînd cei diaminomonocarboxilici. Protaminele sînt solubile în apă, în soluţii acide diluate, în soluţii bazice diluate şi nu coagulează. Au capacitatea de a precipita alte proteine din soluţiile lor.

Protaminele intră în constituţia celulelor germinale mature. Exemple de protamine sînt: *salmina* din lapţii somonului şi *clupeina* din lapţii heringului.

3.8.1.2. *Histonele* sînt mai complexe decît protaminele. Greutăţile lor moleculare sînt cuprinse între 10 000 şi 20 000, fiind constituite în cea mai mare parte din aminoacizi bazici ($pI \simeq 10$). Histonele se dizolvă în aceiaşi solvenţi în care sînt solubile şi protaminele, excepţie fiind faptul că ele sînt precipitate de amoniac pe cînd protaminele se dizolvă în el. Ca şi protaminele, histonele

Scanned with OKEN Scanner

precipită în soluţiile lor alte proteine însă — spre deosebire de protamine — ele coagulează la încălzire.

Histonele se află în celulele germinale imature, în sîngele nevertebratelor (hemocianina) şi vertebratelor (hemoglobina).

Rolul biologic al histonelor este astăzi mult cercetat. Numeroase studii moderne au arătat că aceste proteine au capacitatea particulară de a se combina cu acizii dezoxiribonucleici din cromosomi. Această problemă este prezentată în capitolul următor.

3.8.1.3. *Albuminele* sînt mai complexe decît primele două categorii; au greutăţi moleculare de cca. 60 000. Punctul lor izoelectric este uşor acid ($\simeq 5$). Albuminele sînt foarte solubile în apă dar pot fi precipitate cu soluţie saturată de sulfat de amoniu. Albuminele pot fi uşor coagulate (prin încălzire sau de către alcoolul etilic).

Din punct de vedere chimic, albuminele au conţinut redus de glicocol şi de glucide.

Exemple de albumine sînt: serumalbumina, lactalbumina, ovalbumina, miogenul (din ţesutul muscular). Dintre acestea, interes deosebit prezintă serumalbumina care este cea mai abundentă proteină a serului. Ea este formată dintr-o singură catenă polipeptidică cuprinzînd mai mult de 500 resturi de aminoacizi. Serumalbuminei i se atribuie atît rolul de a menţine constantă presiunea osmotică a serului, cît şi rolul de transportor sanguin al unor molecule mici dar importante din punct de vedere biologic (spre exemplu, medicamente).

3.8.1.4. *Globulinele* sînt prima categorie de proteine simple insolubile în apă pură; au greutăţi moleculare de cca 150 000 şi punct izoelectric în regiunea neutră de pH. În schimb, globulinele sînt solubile în soluţii saline diluate, precum şi în soluţii acide sau bazice diluate. Globulinele sînt precipitate cu soluţii semisaturate de sulfat de amoniu.

O caracteristică a albuminelor şi globulinelor o constituie faptul că ele conţin cantităţi aproape egale din fiecare aminoacid principal (fără a predomina vreunul).

Ca şi albuminele, globulinele se găsesc în plasmă (α-, β- şi γ-globulinele). Unele se găsesc în ţesutul muscular (miozina), altele în ou (ovoglobulina).

3.8.1.5. *Proteinele fibrilare* sînt, în general, proteine animale insolubile, foarte rezistente la digestia cu enzime proteolitice. Din cauza insolubilităţii lor nu li se poate determina greutatea moleculară.

Proteinele fibrilare se găsesc în: piele, păr, unghii, ţesut de susţinere şi oase.

Ele constitue un grup eterogen de proteine numit *scleroproteine*. Dintre acestea fac parte: colagenul, elastina şi keratina.

Colagenul şi elastina sînt de origine mezenchimală; keratina provine din ectoderm.

Colagenul se află în derm, ligamente, tendoane, cartilaje, oase şi alte ţesuturi conjunctive. Aproximativ jumătate din totalitatea proteinelor aflate în organismul omului este reprezentată de colagen.

Colagenul se caracterizează prin insolubilitate în apă, soluţii acide şi bazice diluate; în acestea din urmă, suferă fenomenul de imbibiţie. În schimb, colagenul se dizolvă în acizi şi baze concentrate suferind hidroliză. În apă şi la încălzire (peste 100°) colagenul se transformă în gelatină.

Scanned with OKEN Scanner

Din punct de vedere chimic, colagenul cuprinde cantităţi mari de glicocol (30%), prolină şi hidroxiprolină (25%). Aceşti ultimi doi aminoacizi conferă rigiditatea şi stabilitatea moleculei de colagen (vezi structura sa trifibrilară în fig. III.25). Alte detalii privitoare la structura, biosinteza şi rolul biologic al colagenului sînt prezentate în capitolul privind biochimia ţesutului conjunctiv.

Elastina este o proteină specifică fibrelor elastice. Ea se aseamănă prin majoritatea proprietăţilor (constituţie, solubilitate, funcţii) cu colagenul; se deosebeşte totuşi de acesta prin faptul că nu prezintă imbibiţie, nu formează gelatină şi este hidrolizată (digerată) de tripsină (nu de pepsină care digeră colagenul).

Detalii referitoare la structura şi rolul biologic al elastinei sînt date, ca şi pentru colagen, în capitolul privind biochimia ţesutului conjunctiv.

Keratina este proteina specifică din epiderm, păr, unghii, pene, lînă. Keratina nu este digerată de pepsină şi tripsină; în schimb este hidrolizată de acizi şi baze concentrate.

Din punct de vedere chimic, keratina cuprinde în constituţia sa multă cisteină care-i conferă rigiditate (în special, prin posibilitatea formării de punţi disulfurice). De asemenea, keratina conţine tirozină precum şi numeroase resturi de prolină.

Structura în foaia pliantă a keratinei este asemănătoare cu cea prezentată în fig. III. 23.

3.8.2. PROTEINELE CONJUGATE

Acestea cuprind în moleculele lor pe lîngă partea proteică şi cîte o componentă de natură neproteică, numită *grup prostetic*. Aceasta înseamnă că prin hidroliza proteinelor conjugate se eliberează aminoacizi şi gupe prostetice (substanţe de natură neproteică).

În funcţie de natura grupelor prostetice, proteinele conjugate se împart în 6 categorii: fosfoproteine, glicoproteine, lipoproteine, cromoproteine, metaloproteine şi nucleoproteine (tabelul III.7).

Tabelul III. 7

Categoriile de proteine conjugate

Categoria	Grupul prostetic	Exemplu
fosfoproteine	acid fosforic	caseina din lapte
glicoproteine	glucide (monozaharide şi derivaţi de monozaharide)	γ-globulina din sînge
lipoproteine	lipide (nu toate categoriile)	β-lipoproteina din sînge
cromoproteine	hem (porfirină cu fier)	hemoglobina, citocromul c.
metaloproteine	fier	feritina
nucleoproteine	acizi nucleici	virusul mozaicul tutunului

3.8.2.1. *Fosfoproteinele.* În fosfoproteine grupul lor prostetic (acidul fosforic) esterifică grupări alcoolice din hidroxiaminoacizii (serină şi treonină) ce intră în constituţia componentei proteice. Deşi conţinutul lor în acid fosforic este

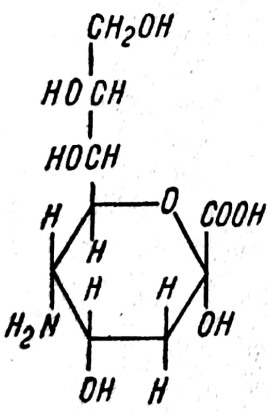
Scanned with OKEN Scanner

redus (0,1—1,1 P%), fosfoproteinele au caracter acid. Ele sînt insolubile în apă şi acizi dar sînt solubile în alcalii (în special, în soluţii de bicarbonaţi alcalini).

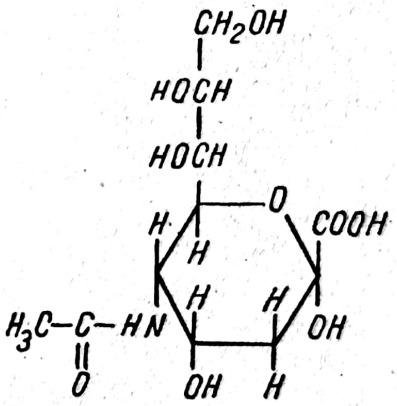
Cele mai importante fosfoproteine de origine animală sînt caseina din lapte, vitelina, vitelenina şi fosvitina din gălbenuşul de ou. Caseina este o fosfoglucoproteină heterogenă. Cea obţinută din laptele de vacă are greutatea moleculară 56 000 şi este formată din două subunităţi egale, cu greutăţi moleculare 28 000, unite prin punţi disulfurice. În caseină 6 resturi de serină şi 1 rest de treonină sînt esterificate cu acid fosforic care, la rîndul său, este salificat cu ioni de calciu. Fosfoproteinele din gălbenuşul de ou sînt foarte bogate în fosfor; în special, fosvitina care conţine şi multe resturi de serină. Aceste fosfoproteine din gălbenuşul de ou sînt sintetizate în ficatul păsărilor.

Unele cercetări recente au arătat că în nucleul celular al eucariotelor se găsesc proteine uşor fosforilabile din categoriile histonelor şi a proteinelor acide. Se pare că în aceste organisme fosforilarea proteinelor menţionate este necesară pentru reglarea activităţii cromatinei.

3.8.2.2. *Glicoproteinele* au drept grup prostetic glucide. Acestea sînt: monozaharide ca atare (manoză, galactoză, xiloză, glucoză, fructoză), acizi uronici (D-glucuronic), aminozaharuri (glucozamină, galactozamină), sau derivaţi ai aminozaharurilor; spre exemplu, acidul neuraminic şi acidul sialic proveniţi din manozamină:



Acid neuraminic



Acid sialic

Este de remarcat faptul că resturi glucidice intră şi în constituţia unor proteine simple din categoria albuminelor. Însă în acestea predomină partea proteică, resturile glucidice aflîndu-se numai într-o foarte mică proporţie. De aceea, s-a convenit să fie socotite glicoproteine numai cele care conţin componente glucidice în proporţii mari (mai mari de 5%).

Glicoproteinele sînt foarte mult răspîndite în organism. Ele predomină în ţesutul conjunctiv, se găsesc în plasmă (haptoglobina, orozomucoidul, factorii grupelor sanguine), în sucul gastric (factorul intrinsec, indispensabil pentru absorbţia vitaminei B_{12}); intră în constituţia unor hormoni (tiroidostimulant, foliculostimulant, luteinizant) şi a unor enzime (în special, transferaze). În ţesuturile care le cuprind, majoritatea glicoproteinelor joacă rolul de substanţe lubrifiante şi protectoare faţă de diverşi agenţi mecanici sau termici.

Dintre glicoproteinele foarte bogate în glucide, deosebit interes prezintă mucinele. Acestea sînt substanţe vîscoase şi care precipită la încălzire sau

la tratare cu acizi (pH: 2—4,5). Cea mai cunoscută mucină este cea secretată în cavitatea bucală de glandele submaxilare. Această mucină conține o cantitate foarte mare de glucide (42%) iar restul — mai mult de jumătate — este constituită din aminoacizi.

Alte glicoproteine de interes biochimic, menționate anterior, vor fi prezentate în capitolele privind țesutul conjunctiv, sîngele și hormonii.

În ultima vreme s-au făcut numeroase studii referitoare atît la structura și biosinteza glicoproteinelor, cît și la catabolismul lor.

Cu privire la structură, s-a arătat că între componenta glucidică și cea proteică a glicoproteinelor se stabilește totdeauna o legătură O-glucozidică sau N-glucozidică, în funcție de natura zaharului și aminoacidului participanți la legătură. Astfel, N-acetilgalactozamina se unește O-glucozidic la grupul oxidril din serină (în mucinele submaxilară și gastrică) sau N-glucozidic la asparagină (în tireoglobulină, ovomucoid, unele transferaze și chiar în ovalbumină), iar galatoza este legată O-glucozidic la oxidrilul hidroxilizinei (în glicoproteinele membranelor bazale glomerulare și în colagen).

Date foarte recente (din ultimii 4—5 ani) au pus în evidență și mecanismul conform căruia se constituie componenta glucidică din glicoproteine. În linii mari, el este următorul: sub acțiunea unor glicoziltransferaze membranare, monozaharide sau diverse substanțe derivate din monozaharide sînt transferate și fixate pe un polimer de natură lipidică, cu moleculă mare (C_{80}—C_{100}) numit poliizoprenol. El joacă rolul de „cărăuș" al radicalilor glicozil în biosinteza glicoproteinelor. Într-adevăr de la acest transportor se transferă ulterior resturile de glucide care se unesc împreună și se fixează (cum s-a menționat) pe catena polipeptidică a glicoproteinei astfel biosintetizate.

Catabolismul normal al glicoproteinelor constă — într-o primă etapă — în hidroliza enzimatică a componentei proteice pînă la aminoacizi și a componentei glucidice pînă la eliberarea tuturor monozaharidelor constituente. În unele organisme lipsesc însă anumite hidrolaze lizozomale specifice (β-galactozidaza, β-N-acetil-glucozaminidaza, α-manozidaza, α-fucozidaza) și, ca urmare, în țesuturile organismelor respective se acumulează glicolipide sau polizaharide nedegradate. În funcție de natura produsului, maladiile corespunzătoare se numesc gangliozidoze, manozidoze, fucozidoze etc.

3.8.2.3. *Lipoproteinele* cuprind drept grup prostetic diverse lipide: colesterol, fosfolipide, gliceride, acizi grași. Lipoproteinele au molecule mari, greutatea lor moleculară depășind uneori 1 000 000 (spre exemplu o β-lipoproteină din serul uman are greutatea moleculară 2 800 000). Faptul că lipoproteinele sînt constituite din componente proteice solubile în apă și componente lipidice hidrofobe, face ca ele să joace un rol important în permeabilitatea selectivă a membranelor. Lipoproteinele au densitate mică, de aceea cînd se află într-un mediu mai dens supus la ultracentrifugare, ele suferă flotație, ridicîndu-se la suprafață. Deoarece diversele lipoproteine se deosebesc între ele printr-un conținut foarte variat de lipide și proteine, fiecare lipoproteină are o constantă de flotație proprie. Constanta de flotație se definește prin inversul constantei de sedimentare.

Lipoproteinele sînt mult răspîndite în organism intrînd în structura membranelor celulare, în mitocondrii și în reticulul endoplasmatic. Lipoproteinele plasmatice migrează electroforetic foarte diferit (α-globuline, β-globuline). În plasmă lipoproteinele îndeplinesc — în special — rolul de transportori ai lipidelor, după cum se arată în capitolul privind biochimia sîngelui.

Scanned with OKEN Scanner

3.8.2.4. *Cromoproteinele* sînt proteine colorate datorită faptului că au drept grupe prostetice substanţe colorate. În cromoproteine grupul prostetic este unit cu partea proteică prin legături saline.

Cromoproteinele sînt foarte variate, atît prin constituţie cît şi prin rolurile fiziologice pe care le îndeplinesc în organism. Astfel, unele cromoproteine sînt considerate proteine respiratorii, avînd rolul de a transporta oxigen în diverse organisme; din această subcategorie face parte hemoglobina care este transportor de oxigen în sîngele vertebratelor. Alte cromoproteine sînt pigmenţi vizuali; spre exemplu, rodopsina (purpura vizuală) din bastonaşele retinei. În sfîrşit, o categorie de cromoproteine sînt enzime (catalaza, peroxidaza, citocromii, flavinenzimele), care participă la procesele de oxidoreducţie celulară. Detalii referitoare la structura şi funcţiile biologice ale fiecărei categorii de cromoproteine menţionate aici, sînt date în capitolele privind respiraţia celulară, biochimia sîngelui şi vitaminele.

3.8.2.5. *Metaloproteinele* sînt proteine conjugate în care grupul prostetic este constituit dintr-un atom (sau din mai mulţi atomi) de metal. Spre deosebire de unele cromoproteine care cuprind metal în grupele prostetice, în metaloproteine metalul este chelat (legat complex) de resturile de aminoacizi din partea proteică a moleculei.

Dintre metaloproteine, prezintă interes deosebit cele care au rolul de a transporta metale (transferina pentru fier, ceruloplasmina pentru cupru) sau de a depozita metale (feritina pentru fier), precum şi unele proteine enzimatice (ascorbatoxidaza conţine Cu, anhidraza carbonică conţine Zn).

3.8.2.6. *Nucleoproteinele* sint categoria de proteine conjugate cuprinzînd drept grupe prostetice acizi nucleici. Aceştia sînt uniţi cu molecule de proteine simple din categoria protaminelor sau histonelor. Nucleoproteinele se găsesc răspîndite în toate ţesuturile din organismele animale. Deşi predomină în nucleele celulare, nucleoproteinele se găsesc şi în citoplasmă fiind asociate, în special, cu ribozomii. Acestea sînt formaţiuni sub-celulare la nivelul cărora se desăvîrşeşte biosinteza proteinelor (aşa cum se arată într-un capitol următor). Sistemele vii simple, de felul virusurilor, par a fi constituite — în întregime — din nucleoproteine pure. Pe de altă parte, cromatina este constituită în mare măsură din nucleoproteine, ceea ce arată că acestea sînt implicate atît în diviziunea celulară, cît şi în transmiterea caracterelor ereditare. Pentru acest motiv, alterări întîlnite în mecamismul formării nucleoproteinelor au repercusiuni defavorabile asupra dezvoltării celulelor şi asupra reproducerii lor.

3.9. FRACŢIONAREA, ANALIZA ŞI CRITERIILE DE PURITATE ALE PROTEINELOR

În numeroase studii biochimice se pune adesea problema cercetării proteinelor unui ţesut sau obţinerea unei anumite proteine în stare pură pentru studierea proprietăţilor sale biologice. În aceste cazuri se procedează la omogenizarea ţesutului, dializarea omogenatului — în scopul îndepărtării moleculelor mici din mediu — iar ulterior se efectuează separarea proteinelor constituente unele de altele. Această separare se mai numeşte şi fracţionarea proteinelor. Pentru realizarea ei se folosesc frecvent metodele descrise în cele ce urmează.

Scanned with OKEN Scanner

3.9.1. METODE CURENTE DE FRACŢIONARE A PROTEINELOR

3.9.1.1. *Precipitarea izoelectrică.* Prin modificarea pH-ului unui mediu cuprinzînd mai multe proteine se realizează pe rînd valori de pH egale cu punctele izoelectrice ale proteinelor respective. Datorită faptului că fiecare proteină precipită la punctul său izoelectric, prin această metodă se poate separa, sub formă de precipitate, un număr apreciabil de proteine avînd puncte izoelectrice la valori de pH foarte diferite.

3.9.1.2. *Cromatografia de absorbţie.* Numeroase substanţe solide, sub formă de pulbere sau de gel, pot fixa proteinele prin legături slabe, relativ puţin specifice. Dintre acestea mai frecvent sînt utilizate: alumina, fosfatul de calciu, silicea, hidroxilapatita şi amidonul. Trecîndu-se un amestec de proteine pe o coloană cuprinzînd una din substanţele menţionate, proteinele sînt reţinute şi apoi pot fi detaşate prin utilizarea diverşilor eluanţi. Dacă eluţia se face selectiv, cu ajutorul unui colector de fracţiuni se poate realiza o separare foarte bună a proteinelor, uneori chiar în stare pură.

3.9.1.3. *Cromatografia pe răşini schimbătoare de ioni.* Aceasta este una din cele mai interesante metode deoarece ea reprezintă o asociere a cromatografiei de absorbţie cu cea de schimb ionic. Se utilizează coloane cuprinzînd substanţe constituite din celuloză pe care sînt fixate grupe ionizate. Aceste substanţe sînt de cele mai multe ori dietilaminoetil-celuloza (DEAE-celuloza) care este un schimbător de anioni şi carboximetil-celuloza (CM-celuloza) care este un schimbător de cationi. Pe asemenea coloane se trece o soluţie tampon cuprinzînd amestecul de proteine. Acestea sînt reţinute atît pe bază de schimb ionic, cît şi datorită absorbţiei. Ulterior se face eluţia folosindu-se soluţii tampon cu pH variabil. În acest mod proteinele se separă în funcţie de sarcinile lor electrice şi pI-ul corespunzător.

3.9.1.4. *Cromatografia de afinitate.* Dacă o proteină este susceptibilă să se combine specific cu un anumit compus, se fixează prin covalenţă acest compus pe un suport pulverulent inert şi se umple cu el o coloană de cromatografie. Aplicînd pe coloana astfel pregătită amestecul proteic, numai proteina care se combină specific cu compusul va fi reţinută. Ulterior proteina este desprinsă cu un eluant potrivit, realizîndu-se astfel separarea din amestec.

3.9.2. ANALIZA ŞI CRITERIILE DE PURITATE

Metodele folosite pentru analiza şi aprecierea purităţii proteinelor sînt mult mai fine decît cele de fracţionare şi utilizează mult mai puţin material proteic. Cele mai frecvent folosite sînt unele metode fizice şi unele metode imunologice.

3.9.2.1. *Metode fizice.* a) *Electroforeza de zonă.* În acest gen de electroforeză deplasarea în cîmp electric a proteinelor se face pe un suport inert care poate fi: hîrtia de filtru, acetatul de celuloză, gelul de amidon sau gelul de poliacrilamidă. Ca şi în cazul electroforezei pe hîrtie a aminoacizilor, suportul solid (sau sub formă de gel) se îmbibă cu tampon şi amestecul de proteine se aplică pe linia de start (în fig. III.29, linia *d* pentru amestecul a două proteine A şi B). După un anumit timp de trecere a curentului electric se pot repera zonele de migrare a proteinelor prin utilizarea unor coloranţi specifici. Poziţia zonelor de migrare depinde de mobilitatea caracteristică a proteinelor în cîmpul electric iar intensitatea coloraţiei sale este proporţională cu concen-

Scanned with OKEN Scanner

trația proteinei în amestec. Această metodă este folosită curent pentru separarea proteinelor.

b) *Izoelectrofocalizarea* (Svensson și Vesterberg). Această metodă este o electroforeză de zonă pe gel care permite separarea și identificarea proteinelor în funcție de punctele lor izoelectrice. În acest gen de electroforeză pH-ul crește de la anod la catod (fig. III.30). Gradientul de pH se obține astfel: se folosește un amestec de multipli acizi alifatici poliaminici-policarboxilici, cu greutăți moleculare medii cuprinse între 300 și 600 care au puncte izoelectrice foarte apropiate unele de altele (cuprinse, spre exemplu, între pH 3 și 10) și care la trecerea curentului electric se separă pe zone cu pH-uri bine determinate. Fiecare acid aminocarboxilic stabilește în zona unde rămîne (este localizat) un pH egal cu punctul său izoelectric. La aplicarea ulterioară pe gelul cu gradient de pH a unui amestec de proteine, fiecare proteină va migra spre zona corespunzătoare punctului său izoelectric unde se va plasa definitiv. Puterea de rezoluție a metodei de izoelectrofocalizare este așa de mare încît, cu ajutorul ei, se pot separa chiar proteine ale căror valori pI variază numai cu 0,02 unități.

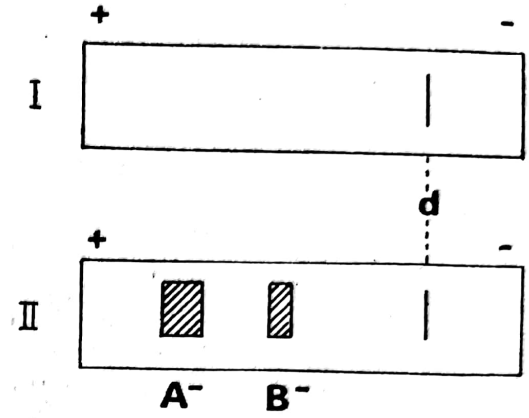


Fig. III.29. Electroforeza de zonă.

3.9.2.2. *Metodele imunologice.* Pe lîngă faptul că aceste metode permit analiza unui amestec proteic, ele ajută la stabilirea identității a două proteine

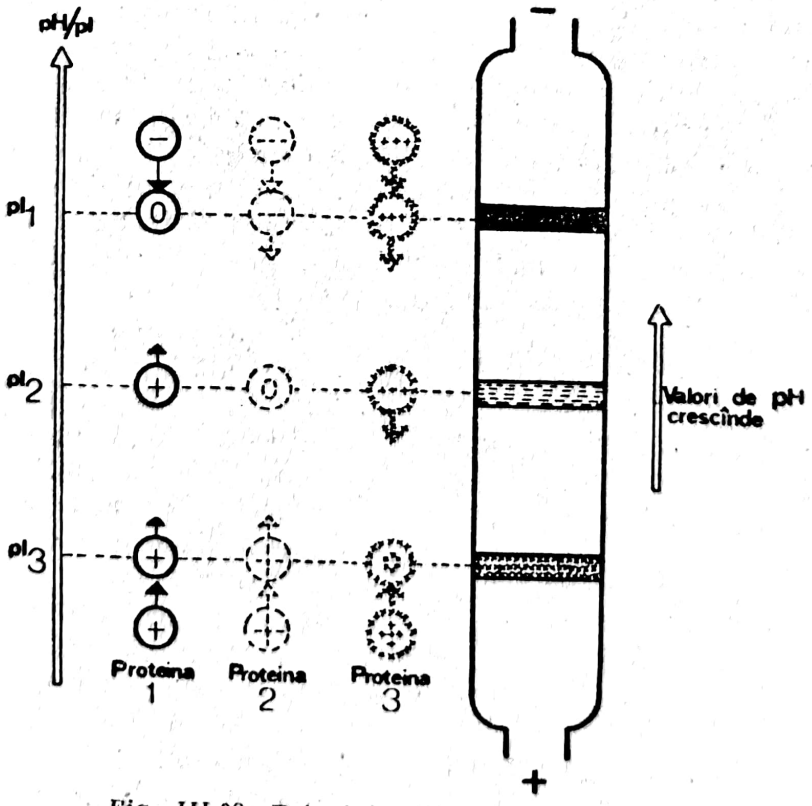


Fig. III.30. Principiul izoelectrofocalizării.

de origini diferite precum şi la verificarea purităţii unei proteine. Dintre metodele imunologice două sînt folosite în mod curent: metoda dublei difuzii şi imunoelectroforeza.

a) *Metoda dublei difuzii* (Oudin-Ouchterlony) se practică în felul următor: într-o capsulă Petri sau pe o lamă de sticlă se toarnă un gel de agar în

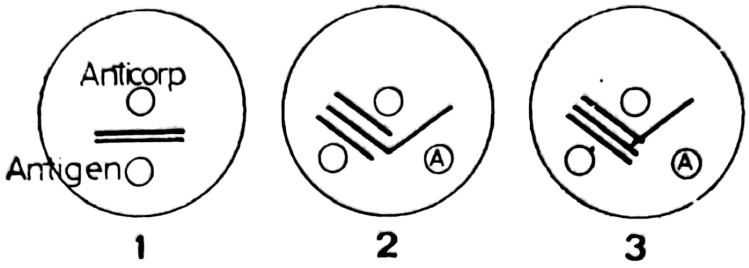


Fig. III.31. Metoda Ouchterlony.

care se fac două orificii. Într-un orificiu se pune antigenul iar în celălalt serul animalului căruia i s-a injectat antigenul. Anticorpul şi antigenul difuzînd în agar se constată că la locul de întîlnire apare un precipitat. Dacă antigenul este format din două proteine, acestea nu difuzează cu aceeaşi viteză şi se formează două linii de precipitare distincte (1 în fig. III.31). Astfel se poate stabili dacă într-un preparat există o proteină unică sau nu.

În cazul în care se urmăreşte existenţa unei anumite proteine (A) într-un preparat proteic complex, se prepară serul conţinînd anticorpi atît faţă de preparatul complex cît şi faţă de proteina A, plasîndu-se într-un orificiu central al plăcii de agar. În acest caz se mai practică două orificii în agar: într-unul se introduce antigenul complex şi în celălalt proteina A. Se observă că între orificiul cu anticorpi şi cel cu antigenul complex se formează mai multe linii de precipitare pe cînd între orificiul central cu anticorpi şi cel cu proteină nu se dezvoltă decît o singură linie de precipitare. Dacă aceasta este în continuarea uneia din liniile formate între anticorpi şi antigenul complex se poate conchide că proteina A se află în complex (2 în fig. III.31). Dacă liniile nu se întîlnesc sau se întretaie (fără a fi nici una în continuare) se poate afirma că proteina A nu se află în complex (3 în fig. III.31). Se înţelege din cele arătate aici că metoda dublei difuzii poate fi utilizată şi ca un criteriu de identificare a proteinelor dar şi ca un criteriu de puritate.

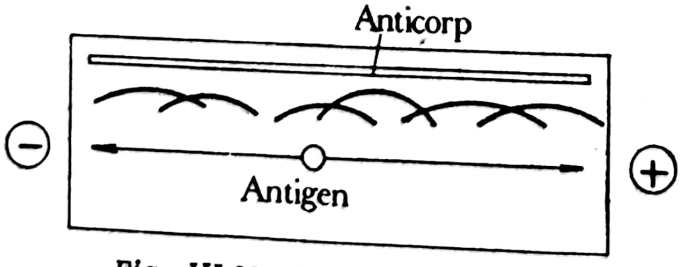


Fig. III.32. Imunoelectroforeza.

b) *Imunoelectroforeza* (Grabar şi Williams). Cînd antigenul este un amestec proteic complex — spre exemplu, serul uman — numărul proteinelor şi deci al liniilor de precipitare este foarte mare astfel încît ele nu se mai pot distinge pe placa de agar. In aceste situaţii, proteinele se separă prin electroforeză pe o lamă de microscop acoperită cu agar. Sub acţiunea curentului electric şi prin antrenare cu soluţia tampon respectivă, proteinele se repartizează în lungul lamei, pornind de la orificiul central. Plasînd anticorpul într-un şanţ longitudinal, fenomenul dublei difuzii se reproduce şi se obţin mai multe arcuri de precipitare, fiecare corespunzînd

Scanned with OKEN Scanner

unei proteine care a difuzat în cerc pornind din locul în care s-a plasat sub acţiunea curentului (fig. III.32).

Imunoelectroforeza este o metodă foarte bună de analiză a proteinelor şi totodată este un excelent criteriu de puritate.

Puritatea unei proteine mai poate fi stabilită şi pe baza altor criterii: cristalizarea, natura şi numărul aminoacizilor N-terminali iar în anumite cazuri prin dozarea unui element caracteristic intrînd în constituţia proteinei (spre exemplu a fierului din hemoglobină sau din citocromi).

Scanned with OKEN Scanner

ENZIMELE

1. INTRODUCERE

Majoritatea proceselor fiziologice desfăşurate în fiinţele vii şi de către fiinţele vii sînt datorate unor şiruri multiple şi complexe de reacţii chimice. În fiecare şir (sau secvenţă) de reacţii participă o mare varietate de constituenţi ai organismului, majoritatea lor fiind inerţi. Reacţiile la care participă în organism aceşti constituenţi adesea nu pot fi reproduse în laborator folosindu-se metodele obişnuite ale chimiei. Dacă totuşi, reacţiile din organism se pot reproduce şi în laborator, condiţiile pentru realizarea lor (concentraţia, reacţia mediului, temperatura, presiunea) sînt mult mai drastice. Există însă posibilitatea de a reproduce şi „in vitro" reacţii din organism, în condiţii asemănătoare, dacă se folosesc extracte de ţesuturi care cuprind anumite substanţe activante. Acestea nu se află decît în fiinţele vii, fiind catalizatori specifici ai reacţiilor metabolice. De aceea, ele poartă numele de *biocatalizatori*. Înainte vreme biocatalizatorilor li s-a spus *fermenţi*, iar apoi li s-a dat numele de *enzime*. Această ultimă denumire provine dintr-un cuvînt grecesc care înseamnă „în drojdie" şi le-a fost atribuit deoarece existenţa enzimelor a fost dovedită mai întîi în urma studiului fermentaţiei alcoolice, determinată de către enzimele din drojdie. De atunci şi pînă azi s-a constatat că majoritatea reacţiilor avînd loc în fiinţele vii (mai simple sau mai complexe) sînt catalizate de enzime. Enzimele îşi îndeplinesc rolul de biocatalizatori în mediul biologic apos. De foarte curînd s-a stabilit însă că reactivitatea în soluţii apoase se păstrează şi cînd enzimele respective se află în stare cristalină. Datele cele mai preţioase în această direcţie au fost furnizate de *crioenzimologie* care permite studierea proceselor enzimatice în amestecuri de solvenţi acvo-organici la temperaturi sub 0°.

Există foarte multe enzime, probabil peste 1000. Numărul mare de enzime corespunde atît multiplelor reacţii, cît şi înaltei lor specificităţi. Deşi specificitatea enzimelor este tratată pe larg mai departe, trebuie menţionat de pe acum că adesea o enzimă catalizează un anumit gen de reacţii sau o singură reacţie dată de o anumită substanţă (substrat). Se numeşte *substrat* compusul chimic asupra căruia acţionează enzima catalizîndu-i transformarea respectivă. Ţinînd seama de această definiţie, se poate afirma că majoritatea substanţelor care participă la reacţiile biochimice din organism, catalizate de enzime, sînt substrate.

Scanned with OKEN Scanner

2. ÎNSUŞIRILE CATALITICE ALE ENZIMELOR

Enzimele prezintă caracteristicile catalizatorilor chimici obişnuiţi. Astfel:

1) Enzimele catalizează numai reacţii posibile din punct de vedere termodinamic. Acestea sînt reacţii exergonice care se desfăşoară spontan. Spre exemplu, dacă reacţia A→B este exergonică, transformarea substanţei A în substanţă B decurge de la sine şi are loc mai bine (mai repede) în prezenţa unei enzime.

Enzima (în general, orice catalizator) grăbeşte reacţia pe care o catalizează scăzîndu-i energia de activare, aşa cum rezultă din fig. IV.1. Într-adevăr, pentru a suferi o transformare chimică un compus trebuie să fie „activat", adică adus într-o stare de tranziţie. Energia necesară pentru atingerea acestei stări de tranziţie variază după cum reacţia este spontană (curba plină), se desfăşoară în prezenţa unui catalizator chimic (curba întreruptă), sau are loc în prezenţa unei enzime specifice (curba punctată). Deci enzima acţionează scăzînd energia de activare. Spre exemplu, în reacţia de descompunere a apei oxigenate:

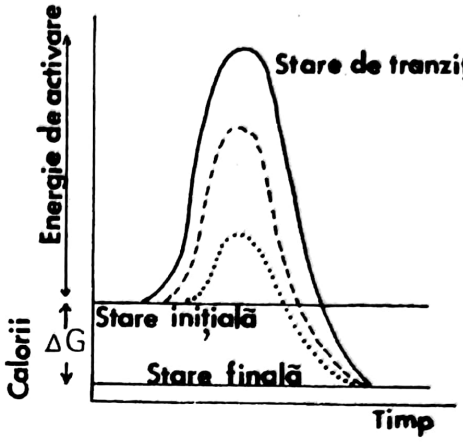


Fig. IV.1. Energia de activare: în reacţie spontană (———), în prezenţa unui catalizator chimic (— — — — —), în prezenţa unei enzime specifice (. . . .).

$$2\,H_2O_2 \rightarrow O_2 + 2\,H_2O$$

energiile de activare sînt următoarele: 18.000 cal/mol H_2O_2 în reacţia fără catalizator, 11.700 cal/mol în prezenţa platinei coloidale şi 5.500 cal/mol în prezenţa enzimei (catalaza).

În exemplul citat anterior (reacţia A→B) transformarea lui B în A este endergonică; ea nu poate avea loc decît dacă este cuplată cu o altă reacţie care-i furnizează energie şi o face astfel posibilă din punct de vedere termodinamic.

2) Enzimele nu modifică echilibrele chimice la care conduc reacţiile reversibile, ci numai accelerează atingerea acestor echilibre catalizînd — în fiecare caz — în mod egal, atît reacţia directă cît şi cea inversă. Astfel, în următoarea reacţie reversibilă:

$$\underset{\text{ester}}{R-COOR'} + \underset{\text{apă}}{H_2O} \rightleftharpoons \underset{\text{acid}}{R-COOH} + \underset{\text{alcool}}{R'-OH}$$

20% 80%

echilibrul este atins cînd se realizează proporţiile indicate de procente, indiferent dacă se porneşte de la amestecul de acid şi alcool sau de la ester şi apă (fig. IV.2). În prezenţa unei enzime se ajunge la acelaşi echilibru final (aceleaşi proporţii între participanţii la reacţie) dar într-un timp mult mai scurt. Intervenţia enzimelor în atingerea mai rapidă a echilibrului la care conduce orice reacţie reversibilă este un fapt bine stabilit care — în princi-

piu — nu suferă excepţie. Cu toate acestea, în cazul reacţiilor desfăşurate în celulele organismelor, faptele se prezintă puţin diferit; în special, cînd este vorba de reacţii polienzimatice. Într-adevăr, într-o celulă reacţiile nu sînt izolate ci adesea o aceeaşi substanţă (un acelaşi substrat) poate fi angajat în mai multe căi metabolice:

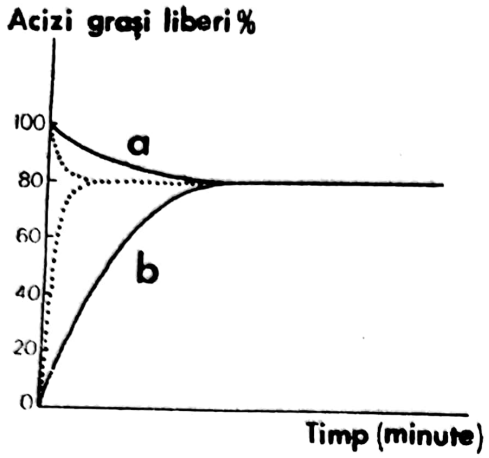


Fig. IV.2. Echilibrul între ester acid şi alcool: pornind de la acid gras şi alcool (a) sau de la ester (b). În prezenţa enzimei (....) se ajunge la acelaşi echilibru dar mult mai repede.

$$A \rightarrow B \begin{matrix} \overset{1}{\nearrow} C \rightarrow D \rightarrow E \\ \underset{2}{\searrow} L \rightarrow M \rightarrow N \end{matrix}$$

În schema precedentă, B se poate transforma în C sau în L prin reacţiile 1 sau 2 care sînt în competiţie. Dacă enzima care catalizează reacţia 1 (B → C) este mai activă, în celulă se va forma produsul final E. Dacă, în schimb, enzima care catalizează reacţia 2 (B → L) este mai activă, se va forma numai produsul final N. Prin urmare, deşi enzimele nu pot modifica din punct de vedere cantitativ proporţiile substanţelor prezente la echilibru, în celule sînt posibile modificări calitative, în funcţie de enzima care predomină prin activitatea sa la un moment dat.

3) Enzimele îşi exercită acţiunea catalitică intervenind în cantităţi foarte mici. Aşa cum se va arăta mai departe, o singură moleculă de enzimă poate transforma mai multe sute, mii sau chiar milioane de molecule participante la reacţii. Disproporţia considerabilă dintre cantitatea de enzimă şi cantitatea de substanţă transformată sub acţiunea sa catalitică reiese imediat din următoarele exemple: 1 g urează eliberează din uree (la pH = 7 şi t° = 20°C) în timp de 5 minute 155 g amoniac iar o moleculă de catalază descompune 5 milioane de molecule de apă oxigenată într-un minut (la 0° şi pH = 6,8).

4) Enzimele îşi păstrează intactă structura dinaintea reacţiei şi după desfăşurarea acţiunii catalitice; modificările eventuale din cursul procesului catalitic sînt numai tranzitorii (vezi mai departe mecanismul acţiunii enzimatice).

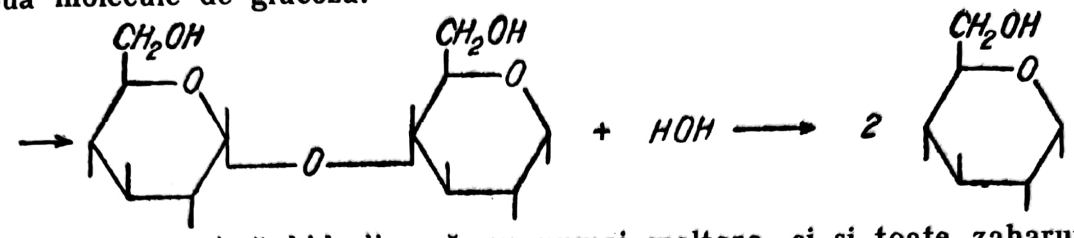
5) Specificitatea enzimatică este mult mai accentuată decît a celorlalţi catalizatori. De fapt, la enzime se întîlnesc 4 feluri de specificităţi: (a) absolută, (b) de grup, (c) largă, (joasă) şi (d) stereochimică.

a. *Specificitate absolută.* Spunem că o enzimă are specificitate absolută atunci cînd ea catalizează o anume reacţie dată de o singură substanţă. Spre exemplu, ureaza catalizează reacţia de hidroliză a ureei:

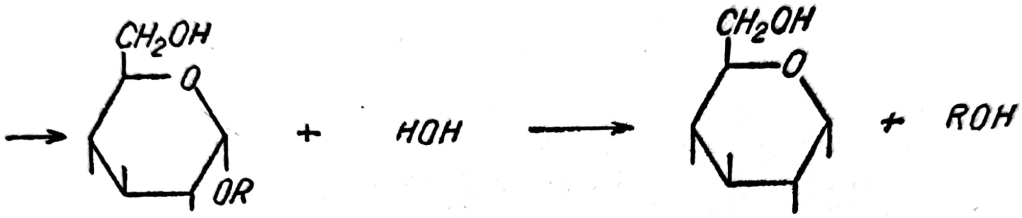
$$O{=}C(NH_2)_2 + HOH \rightarrow 2\,NH_3 + CO_2$$

b. *Specificitate de grup.* Enzimele care prezintă specificitate de grup catalizează o anume reacţie dar care nu este dată numai de o singură substanţă, ca în cazul precedent, ci de un grup de substanţe strict înrudite. Spre

exemplu, maltaza din intestin catalizează hidroliza maltozei cu formarea a două molecule de glucoză.



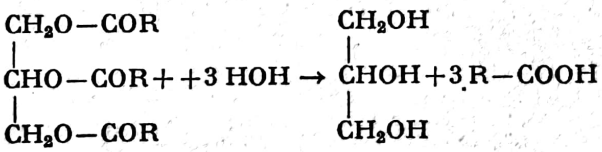
Însă această enzimă hidrolizează nu numai maltoza, ci şi toate zaharurile în care se află o *moleculă de glucoză legată α-glucozidic*; deci toţi compuşii de tipul α-glucozizilor:



Deoarece şi în cazul acestora, reacţia catalizată de maltaza din intestin constă tot în hidroliza legăturii α-glucozidice, maltaza din intestin este o α-glucozidază care poate cataliza hidroliza întregului grup al α-glucozidelor; deci ea are specificitate de grup.

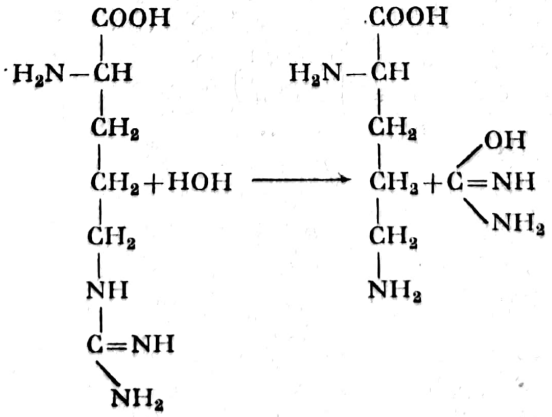
c. *Specificitate largă sau joasă.* Acest gen de specificitate îl prezintă enzimele care catalizează o reacţie avînd loc la nivelul unui anume gen de legătură aflată la numeroase substanţe.

Spre exemplu, lipazele catalizează hidroliza gliceridelor:



dar şi a altor esteri ai acizilor graşi (cu alţi alcooli).

d. *Specificitate stereochimică.* Se spune că o enzimă posedă specificitate stereochimică atunci cînd ea catalizează reacţii la care participă sau în care ia naştere un anume izomer steric (optic sau geometric) şi nu poate cataliza reacţiile în care participă sau ia naştere celălalt izomer steric. Spre exemplu, *arginaza* — enzimă care participă la sinteza ureei — hidrolizează numai *L-arginina* (aminoacidul natural):



De asemenea, succinatdehidrogenaza din organism catalizează dehidrogenarea acidului succinic, conducînd totdeauna la formarea acidului fumaric (izomer *trans*) şi niciodată la acid maleic (izomer *cis*):

$$HOOC-CH_2-CH_2-COOH \underset{+2H}{\overset{-2H}{\rightleftharpoons}} \begin{matrix} H-C-COOH \\ \| \\ HOOC-C-H \end{matrix}$$

6) Ca şi catalizatorii chimici, enzimele îşi micşorează sau îşi suprimă total activitatea catalitică în prezenţa unor substanţe numite în general inhibitori (vezi mai departe inhibiţia enzimatică).

3. NATURA ŞI STRUCTURA ENZIMELOR

Spre deosebire de catalizatorii chimici obişnuiţi care sînt substanţe anorganice sau organice cu moleculă mică, enzimele sau biocatalizatorii sînt substanţe organice cu moleculă mare şi de natură proteică, produse în organismele vii.

Deşi acţiunea catalitică a enzimelor este cunoscută de foarte multă vreme, natura lor proteică a fost stabilită numai în ultimii 55 ani. În această perioadă s-au obţinut numeroase enzime în stare pură, cristalină şi pentru multe din ele s-a confirmat, în mod evident, faptul că sînt de natură proteică.

Din punct de vedere structural, enzimele se împart în două categorii:

— enzime de natură exclusiv proteică, constituite în întregime din proteine, şi

— enzime de natură heteroproteică formate din două părţi: una proteică, numită apoenzimă şi una neproteică, numită coenzimă.

3.1. ENZIME DE NATURĂ EXCLUSIV PROTEICĂ

Un exemplu de enzimă constituită integral din proteină este ribonucleaza. Această enzimă catalizează hidroliza acizilor ribonucleici (ARN) eliberînd mononucleotidele componente. Structura ribonucleazei (bovine) constituită din 124 aminoacizi, este prezentată în fig. IV.3 şi schematic în fig. IV.4. Ea se menţine în forma prezentată, datorită celor 4 legături disulfurice (marcate prin liniile îngroşate).

Regiunea din molecula ribonucleazei cuprinsă între aminoacizii 31 şi 41 (marcată punctat în fig. IV.4), conţinînd 5 aminoacizi bazici, fixează molecula de ARN care este un acid. Această regiune face parte din „centrul activ" sau situsul activ al ribonucleazei.

3.1.1. SITUSUL ACTIV

Se numeşte situs activ (sau centru activ) al unei enzime ansamblul aminoacizilor din constituţia proteinei enzimatice care vin în contact cu substratul; în cazul ribonucleazei, cu ARN-ul. În situsul activ al unei enzime se deosebesc două regiuni distincte: una de fixare a substratului şi una catali-

Scanned with OKEN Scanner

tică (situsul catalitic) care acţionează asupra substratului fixat, înlesnindu-i reacţia chimică respectivă. În cazul ribonucleazei, situsul catalitic cuprinde două resturi de histidină, His 12 şi His 119. His 12 acţionează asupra hidroxilului ribozei şi His 119 asupra radicalului fosforic, producînd desfacerea

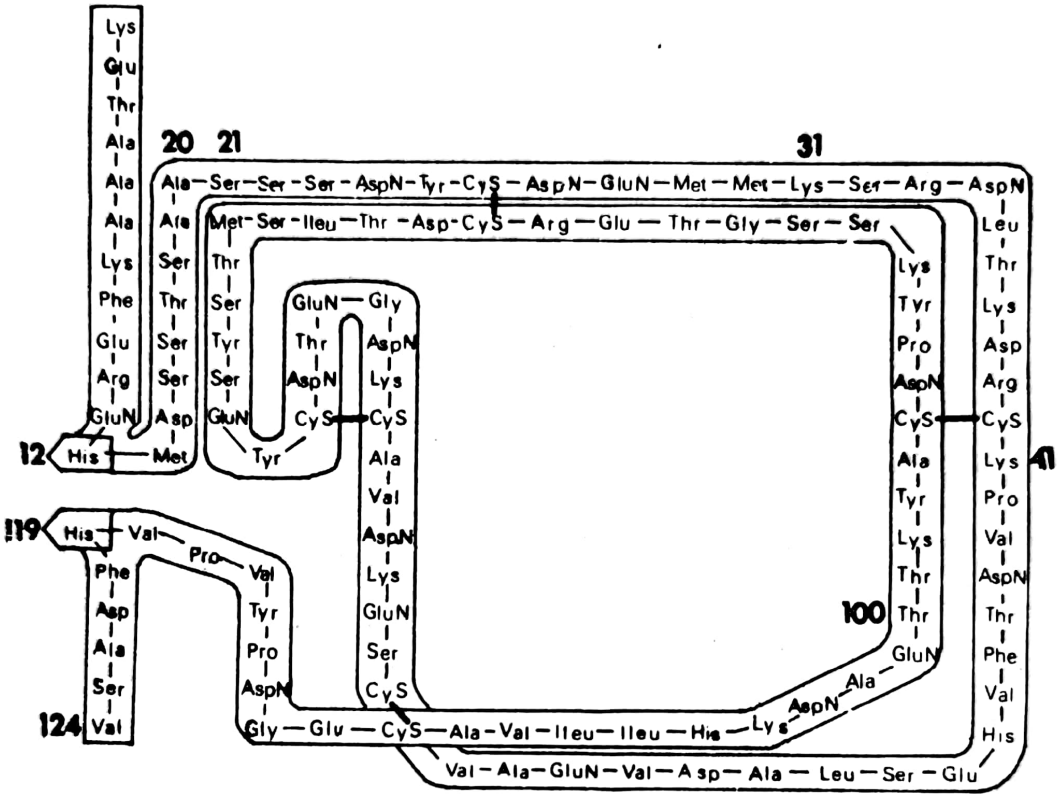


Fig. IV.3. Structura ribonucleazei bovine.

legăturii esterfosforice din moleculă. Din schema prezentată în fig. IV. 4 rezultă imediat că în molecula ribonucleazei, datorită legăturilor disulfurice, aminoacizii din situsul activ sînt foarte apropiaţi (atît cei care fixează ARN-ul, cît şi cei responsabili de activitatea catalitică His 12 şi His 119).

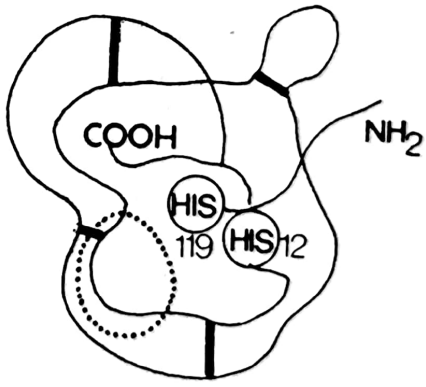


Fig. IV.4. Ribonucleaza.

În situsul catalitic al majorităţii enzimelor cunoscute se găseşte adesea unul sau mai mulţi din următorii aminoacizi: serină, cisteină, histidină, tirozină şi lizină. Multe enzime hidrolitice (proteolitice, fosfataza alcalină, esteraza) cuprind serină în centrul lor activ. Spre exemplu, colinesteraza care hidrolizează acetilcolina în acid acetic şi colină:

$$CH_3-CO-O-CH_2-CH_2-N^+(CH_3)_3 \xrightarrow{+HOH} CH_3-COOH+HOCH_2-CH_2-N^+(CH_3)_3$$

are un situs de fixare a substratului format din două părţi: una esterazică ce fixează acetilul la nivelul legăturii esterice şi una anionică ce fixează azotul

Scanned with OKEN Scanner

cu sarcina sa pozitivă (fig. IV.5.). Situsul catalitic cuprinde trei aminoacizi: serina şi histidina pe de o parte, care participă la refacerea carboxilului acidului acetic şi pe de altă parte, tirozina care ajută la reconstituirea grupului alcoolic din colină, în desfacerea hidrolitică a legăturii esterice:

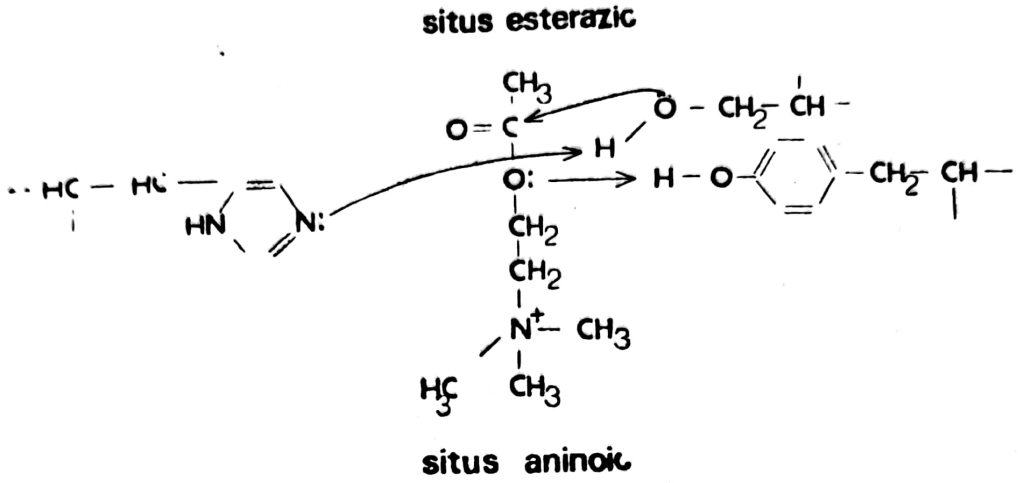


Fig. IV.5. Situsul esterazic şi situsul anionic al acetilcolinesterazei.

Într-adevăr, aşa cum rezultă din schemă, dubletul electronic neparticipant al azotului din histidină atrage protonul atomului de hidrogen din oxidrilul serinei, iar oxigenul acestuia — avînd un exces de sarcini negative — este atras de grupul CO din radicalul acetil. Acest fapt determină îndepărtarea dubletului de electroni neparticipanţi de la oxigenul colinei către protonul din oxidrilul tirozinei. Legătura esterică $-C(=O)-O-$ este astfel labilizată din

douăă părţi şi se desface uşor prin reconstituirea grupărilor participante: carboxil şi oxidril alcoolic.

Generalizînd cele analizate în cazul acetilcolinei, se poate spune că acţiunea unei enzime asupra substratului se explică atît prin dispunerea favorabilă în centrul catalitic a grupărilor atrăgătoare şi respingătoare de electroni, cît şi prin mobilizarea deosebită a electronilor, favorizată de configuraţia proteinei enzimatice.

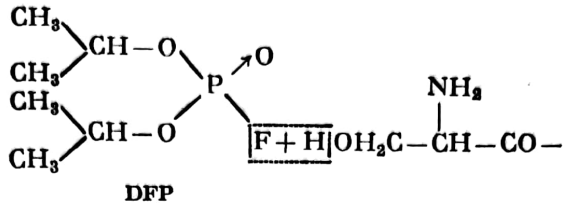
3.1.2. EVIDENŢIEREA SITUSULUI ACTIV

Cea mai logică tehnică de punere în evidenţă a situsului activ dintr-o enzimă pare a fi cea de formare a unei combinaţii între enzimă şi substrat şi de identificare în combinaţia rezultată a regiunii din enzimă care a fixat substratul. În fapt, aceasta nu se poate realiza decît foarte rar (vezi mai departe la mecanismul reacţiilor enzimatice) deoarece legătura enzimei cu substratul este foarte labilă şi complexul enzimă-substrat, de cele mai multe ori, nu se poate izola. Cu toate acestea, în unele cazuri, se poate modifica din punct de vedere chimic substratul, astfel încît să se stabilizeze complexul enzimă-substrat. Metoda cea mai des folosită în acest scop constă în combinarea specifică a anumitor substanţe cu aminoacizii. Dacă aceşti aminoacizi fac parte din situsul activ, enzima se inactivează. Astfel:

— diizopropilfluorofosfatul (DFP) se combină specific cu serina, aflată

Scanned with OKEN Scanner

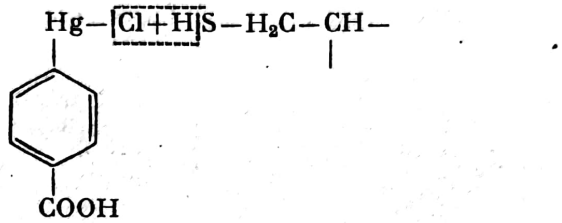
în centrul activ al majorității hidrolazelor, devenind astfel un inhibitor al acestor enzime; de exemplu, al colinesterazei.



DFP

Acest compus (DFP) a fost descoperit datorită proprietății sale de a acționa ca un agent toxic asupra sistemului nervos (colinesteraza, cu serină în situsul catalitic, fiind implicată în transmisia influxului nervos).

— paraclormercuribenzoatul (PCMB) se combină specific cu resturile de cisteină:



Deoarece cisteina se află în situsul activ al majorității dehidrogenazelor PCMB este un inhibitor al acestor enzime, blocînd totodată reacțiile metabolice catalizate de dehidrogenaze.

3.2. ENZIME DE NATURĂ HETEROPROTEICĂ

Așa cum s-a mai menționat, orice enzimă din această categorie cuprinde o parte proteică (apoenzima) și o parte neproteică (coenzima). În procesul enzimatic apoenzima fixează substratul iar coenzima desăvîrșește reacția chimică. Este de remarcat însă că apoenzima condiționează și natura reacției efectuată de coenzimă. Într-adevăr, transaminazele (enzime care transportă un grup amino de la un aminoacid la un cetoacid) și decarboxilazele aminoacizilor (enzime care catalizează decarboxilarea aminoacizilor) au aceeași coenzimă, piridoxal-fosfatul și același substrat, aminoacidul. Deosebirea de reacție este deci legată de existența a două apoenzime diferite.

În unele cazuri, coenzima este foarte strîns legată de apoenzimă și nu se poate detașa de aceasta din urmă decît prin denaturarea apoenzimei. În alte cazuri, coenzima se detașează foarte ușor de apoenzimă; spre exemplu, prin simplă dializă. Acest ultim fapt explică de ce dializa diverselor preparate biologice antrenează adesea inactivarea enzimelor pe care le cuprind.

3.2.1. DIVERSE CATEGORII DE COENZIME

3.2.1.1. *Coenzimele provenite din vitamine hidrosolubile* sînt numeroase. În majoritatea cazurilor, mici transformări ale moleculelor de vitamine hidrosolubile sînt suficiente pentru constituirea de coenzime cu roluri metabolice importante.

Relația dintre coenzime și vitaminele hidrosolubile constitutive reiese imediat din tabelul IV.1 în care s-au precizat și exemple de enzime

Scanned with OKEN Scanner

cuprinzînd coenzimele menţionate, precum şi tipurile de reacţii la care participă coenzimele respective. Cu excepţia coenzimei B_{12}, a cărei vitamină de provenienţă are structura chimică menţionată în capitolul XX privind

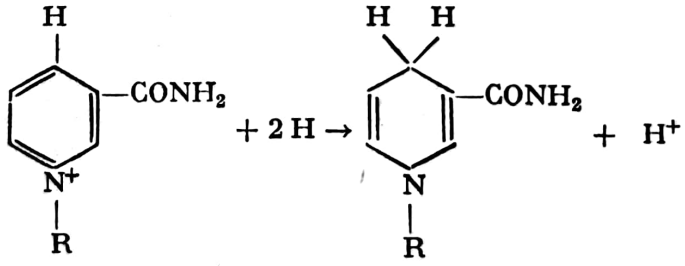
Tabelul IV.1

Vitaminele hidrosolubile şi coenzimele corespunzătoare

Vitamina hidrosolubilă	Coenzima
Vitamina B_1 (tiamina)	Tiaminpirofosfatul (TPP)
Vitamina B_2 (riboflavina)	Flavin mononucleotidul (FMN)
	Flavin adenin-dinucleotidul (FAD)
Vitamina PP (nicotinamida)	Nicotinamidadenindinucleotidul (NAD)
	Nicotinamidadenindinucleotidfosfat (NADP)
Vitamina B_6 (piridoxal)	Piridoxalfosfatul
Acidul pantotenic	Coenzima A
Biotina	Biotina
Acidul folic	Acidul tetrahidrofolic (FH_4 sau H_4-folat) şi derivaţii săi (vezi tabelul IV.2)
Vitamina B_{12} (cobalamina)	Coenzima B_{12}
Acidul lipoic	Acidul lipoic

vitaminele, structurile tuturor celorlalte coenzime figurînd în tabelul IV.1 sînt prezentate mai departe (pag. 105).

Unele date referitoare la coenzimele dehidrogenazelor: *NAD, NADP, FMN şi FAD*. Nicotinamidadenindinucleotid (NAD) şi nicotinamidadenindinucleotidfosfat (NADP) sînt coenzime pentru un număr foarte mare de dehidrogenaze (cca 200) care au capacitatea de a cataliza dehidrogenarea diverselor substrate ce se oxidează în lanţul respirator. Scriind în formă generală structura piridinnucleotidelor NAD şi NADP ca mai jos, se observă imediat că transferul hidrogenului are loc la nivelul nucleului piridinic:



NAD-ul a fost descoperit de Harden şi Young, în 1904, cu ocazia cercetărilor efectuate de ei asupra fermentaţiei, la drojdii. În 1936, von Euler l-a obţinut în stare pură şi i-a dat numele iniţial de coenzima I. Cînd, ulterior, i s-a stabilit şi structura chimică, s-a numit difosfopiridinnucleotid (DPN) iar mai nou, tot datorită structurii chimice, NAD.

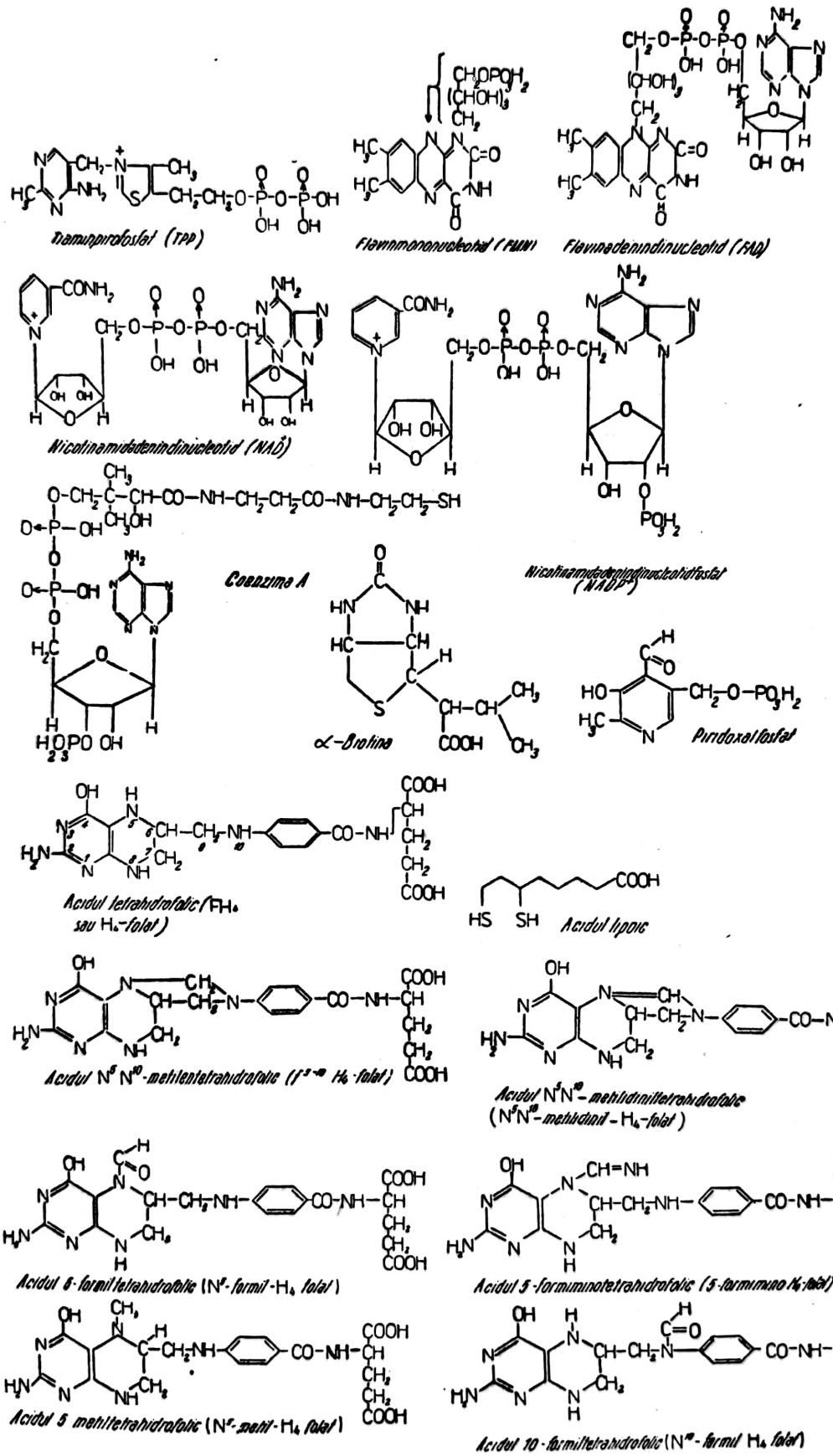
NADP-ul a fost descoperit în 1931 de către Warburg şi Christian, cu ocazia cercetării dehidrogenazelor din eritrocite. Ei l-au numit coenzima II. În 1935 i s-a stabilit structura şi — potrivit acesteia — a fost numit trifosfopiridinnucleotid (TPN) iar apoi, corespunzător aceleiaşi structuri, i s-a dat numele de NADP.

NAD-ul şi NADP-ul se află în toate celulele vii, însă NAD-ul predomină; concentraţia sa fiind cu un ordin de mărime superioară celei a NADP-ului.

Scanned with OKEN Scanner

Tabelul IV.2

Structurile chimice ale coenzimelor provenite din vitamine hidrosolubile



În celulele organismului NAD-ul participă, în special, la reacţii pe seama cărora se furnizează energie iar NADP-ul ia parte, mai ales, la reacţii de sinteză. Deosebit de interesant este însă faptul că pentru diversele organe există raporturi bine determinate şi constante între forma oxidată şi forma redusă a fiecărui piridinnucleotid. De asemenea, este de remarcat că pe măsură ce se reduc, coenzimele piridinice îşi modifică absorbţia caracteristică a luminii. Spre exemplu, la 340 nm absorbţia luminoasă creşte prin reducere; la această lungime de undă forma redusă prezintă un maxim de absorbţie (fig. IV.6).

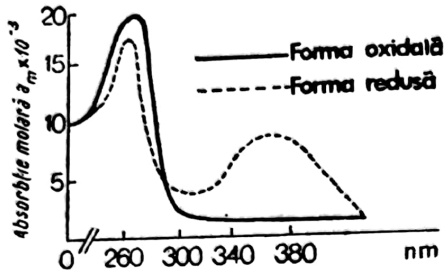
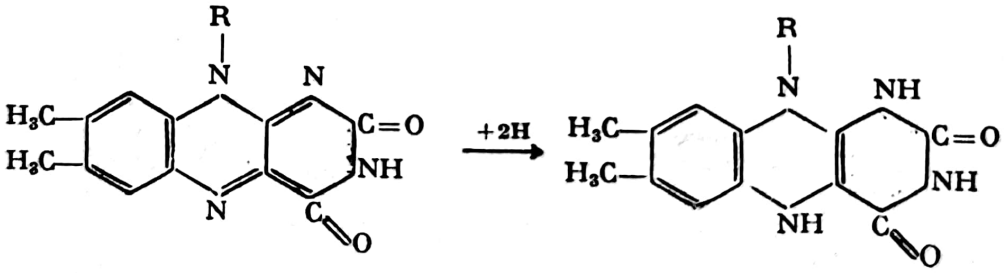


Fig. IV.6. Spectrele de absorbţie ale formelor *oxidată* şi *redusă* corespunzătoare piridinnucleotidelor NAD şi NADP.

În sfîrşit, o altă caracteristică a piridinnucleotidelor NAD şi NADP este natura deosebit de labilă a legăturii pe care ele o stabilesc cu partea proteică atunci cînd se constituie holoenzimele dehidrogenazelor corespunzătoare.

Flavinmononucleotidul (FMN) şi flavinadenindinucleotidul (FAD) sînt coenzimele flavinenzimelor, mult răspîndite în ţesuturile animale şi vegetale. Flavinenzimele sau flavoproteinele poartă aceste denumiri datorită culorii galbene (flavum) conferită de structura chimică a coenzimelor corespunzătoare (forma oxidată).

În scopul ilustrării modului în care are loc transferul hidrogenului de către FMN sau FAD se scrie structura lor în formă generală şi se observă că fixarea hidrogenului are loc la nivelul nucleului izoaloxazinic:



Spre deosebire de dehidrogenazele piridinnucleotidice, la flavinenzime coenzimele FMN sau FAD sînt mult mai strîns unite cu partea proteică respectivă prin legături chimice covalente. În schimb, ca şi în cazul coenzimelor piridinice, prin reducere, coenzimele flavinice îşi modifică absorbţia luminoasă (la 450—460 nm).

O caracteristică a flavoproteinelor o constituie faptul că ele au capacitatea să dehidrogeneze $NADH_2$ sau $NADPH_2$ dar pot dehidrogena şi direct unele substrate (acid succinic, aminoacid).

3.2.1.2. *Coenzimele tetrapirolice* au structură foarte asemănătoare cu cea a hemului din hemoglobină. Aceste coenzime cuprind şi ioni metalici; în special, Fe care poate exista în două stări de oxidare diferite: Fe^{2+} şi Fe^{3+}. Asemenea coenzime intervin în transferul de electroni. Exemple de coenzime tetrapirolice sînt: citocromii (vezi „lanţul respirator" în capitolul VIII), catalaza şi peroxidaza.

3.2.1.3. *Coenzimele metalice.* Numeroase enzime cuprind metal angajat într-un complex disociabil din care poate fi detaşat în stare de ion. Procesul

Scanned with OKEN Scanner

acesta este reversibil, în sensul că ionul metalic poate fi reintegrat în complex trecînd în stare de atom. Principalele enzime metalice de acest tip sînt polifenoloxidazele (cu cupru), anhidraza carbonică (cu Zn), peptidazele (cu Mn, Fe, Mg, după caz), fosfatazele (cu Mg), arginaza (cu Mn). Este de remarcat că toate enzimele de acest tip sînt inactivate prin eliminarea metalului şi reactivate prin fixarea lui sau uneori, prin fixarea unui cation de metal vecin cu cel natural în tabloul periodic (deci cu structură atomică asemănătoare). Spre exemplu, arginaza din ficat, inactivată prin pierderea Mn, îşi recapătă acţiunea hidrolitică prin adaos de Mn^{2+} sau Co^{2+}. În schimb, polifenoloxidaza din cartofi se inactivează prin pierderea cuprului şi îşi recapătă acţiunea catalitică numai prin adaos de Cu^{2+}.

Rolul metalului în sistemele enzimatice este adesea de element de legătură prin formarea unui complex între proteina enzimatică şi substrat. Spre exemplu, Mg este necesar pentru fixarea ATP-ului pe kinaze iar Zn pentru fixarea peptidelor pe carboxipeptidaze.

Metalele intervin uneori în reacţiile enzimatice numai pentru a deplasa echilibrul reacţiei prin eliminarea unui produs final. În felul acesta se explică importanţa calciului pentru activitatea lipazelor. Într-adevăr, în aceste condiţii se formează săpunuri de calciu insolubile, ceea ce determină deplasarea de la stînga la dreapta a echilibrului reacţiei (reversibile) de hidroliză a grăsimilor, catalizată de lipaze.

4. CINETICA ENZIMATICĂ

4.1. MECANISMUL ACŢIUNII ENZIMATICE

Într-un proces enzimatic enzima (E) formează cu substratul (S) un produs intermediar, foarte reactiv dar cu o viaţă foarte scurtă (ES) în care substratul se află în stare activată. Atîta timp cît se află în această formă de produs intermediar activ, ES, substratul suferă unele modificări (în genere, electronice). Acestea sînt efectuate în interacţiunea substratului cu centrul activ al enzimei. Datorită modificărilor, ES devine EP. După modificare se elimină imediat produsele de reacţie (P) şi totodată, se eliberează centrul activ al enzimei (E), în vederea fixării altei molecule de substrat. Procesul se reia, în mod ciclic, producîndu-se cu o viteză foarte mare.

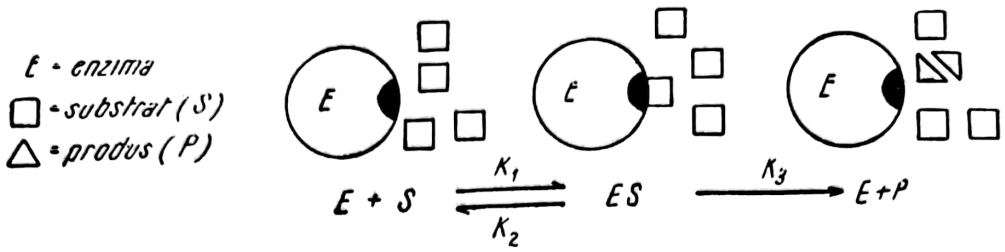
Mecanismul poate fi schematizat astfel:

$$(1)\quad E+S \underset{K_2}{\overset{K_1}{\rightleftharpoons}} ES \underset{K_4}{\overset{K_3}{\rightleftharpoons}} EP \underset{K_6}{\overset{K_5}{\rightleftharpoons}} E+P$$

Deoarece transformarea ES→EP se face practic instantaneu şi pentru că reacţia finală enzimatică de transformare a produşilor E şi P în EP este nulă ($K_6=0$) — enzima este specifică pentru substrat şi nu şi pentru produse — relaţia (1) devine:

$$(2)\quad E+S \underset{K_2}{\overset{K_1}{\rightleftharpoons}} ES \xrightarrow{K_3} E+P$$

Schema desfăşurării reacţiei enzimatice potrivit relaţiei (2) este:



Comparînd vitezele cu care decurg cele două reacţii (cea reversibilă şi cea ireversibilă) se constată că totdeauna reacţia ireversibilă ES→E+P, decurge mult mai încet decît reacţia reversibilă. Aceasta înseamnă că „determinanta de viteză" în procesul enzimatic este reacţia de transformare a complexului ES în produşii de reacţie şi enzima liberă, deci:

(3) V=K[ES] în care:

V=viteza procesului enzimatic şi
K=constanta de viteză a reacţiei.

4.2. EXPRIMAREA ACTIVITĂŢII ENZIMATICE

Pentru exprimarea activităţii enzimatice trebuie să se folosească un factor cu ajutorul căruia să se precizeze măsura în care enzima este aptă să influenţeze viteza reacţiei catalizate. În acest scop se folosesc mai frecvent, trei mărimi:

a) *Unitatea enzimatică* (U). Aceasta este cantitatea de enzimă care poate cataliza transformarea unui micromol de substrat în timp de un minut.

b) *Activitatea molară.* Aceasta este dată de numărul de *molecule de substrat* transformate în produse, într-un minut, sub influenţa *unui mol de enzimă.* O enzimă poate modifica într-un minut cantităţi de 1 000 ori sau chiar mai mari de substrat, faţă de propria ei greutate. De aceea, pentru exprimarea cu ajutorul activităţii molare, este necesară cunoaşterea activităţii moleculare a enzimei. În tabelul IV.3 sînt consemnate activităţile molare ale unor enzime (stabilite la diverse temperaturi).

Tabelul IV.3

Activitatea molară pentru cîteva enzime

Enzima	t°	Activitate molară
Acetilcolinesteraza	30°	90 000
Catalaza (ficat de cal)	0°	5 000 000
Lactatdehidrogenaza (muşchi)	20°	34 000
Pepsina (stomac de bou)	0°	1 000

c) *Katalul* (Kat). Acesta reprezintă cea mai nouă unitate introdusă pentru exprimarea activităţii enzimatice. Katalul este cantitatea de enzimă care catalizează o reacţie în ritm de 1 mol în timp de o secundă. Cu alte cuvinte, katalul reprezintă cantitatea de enzimă care catalizează transformarea unui mol de substrat pe secundă.

Se cunosc şi se folosesc atît multiplii katalului (exemplu, kilokatalul = k kat) cît şi submultiplii lui (exemplu, milikatalul=m kat).

Scanned with OKEN Scanner

4.3. DETERMINAREA VITEZEI UNEI REACŢII ENZIMATICE

Pentru determinarea vitezei unei reacţii enzimatice se procedează în felul următor: se măsoară la diverse intervale de timp (t_1, t_2 ···) cantităţile de produs format (P_1, P_2 ···) şi se trasează curba de progres a procesului

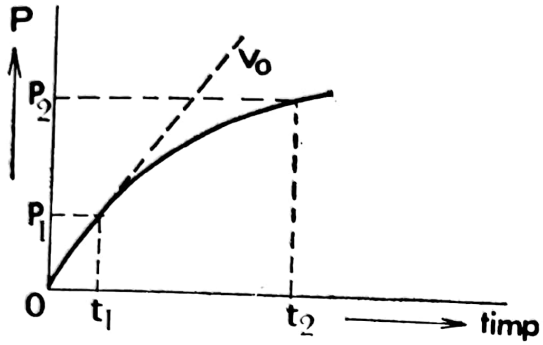


Fig. IV.7. Curba de progres a unei reacţii enzimatice şi viteza instantanee.

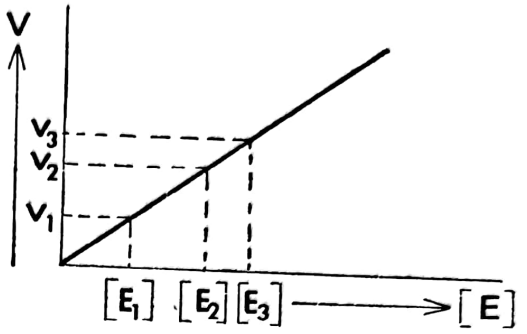


Fig. IV.8. Variaţia vitezei unei reacţii enzimatice în funcţie de concentraţia enzimei.

luat în considerare (fig. IV.7). Ulterior, se trasează dreapta corespunzătoare pantei maxime a curbei. Aceasta măsoară *viteza iniţială* sau *viteza instantanee*, v_0, a reacţiei. Ea corespunde concentraţiei iniţiale a substratului, înainte de formarea produsului P. Această *viteză instantanee* sau *iniţială* (măsurată la timpul zero) reprezintă viteza reacţiei enzimatice.

4.4. RELAŢIA DINTRE VITEZA UNEI REACŢII ENZIMATICE ŞI CANTITATEA DE ENZIMĂ CARE O CATALIZEAZĂ

Cînd determinarea vitezei unei reacţii enzimatice se face corect, adică prin viteza instantanee iniţială, se constată că viteza reacţiei enzimatice variază proporţional cu cantitatea (concentraţia) enzimei.

O asemenea determinare se face urmărind, spre exemplu, variaţia vitezei reacţiei de descompunere a unei aceleiaşi cantităţi de uree sub acţiunea unor concentraţii deosebite de enzimă (urează). Se obţine o curbă de felul celei din fig. IV.8.

4.5. RELAŢIA DINTRE VITEZA UNEI REACŢII ENZIMATICE ŞI CONCENTRAŢIA SUBSTRATULUI ASUPRA CĂRUIA ACŢIONEAZĂ ENZIMA

Pentru stabilirea unei asemenea relaţii se procedează experimental în felul următor: se determină de foarte multe ori o aceeaşi reacţie enzimatică, în aceleaşi condiţii, folosind aceeaşi cantitate de enzimă dar cantităţi crescînde de substrat (tabelul IV.4). În cazul fiecărei experienţe se măsoară viteza iniţială a reacţiei (în condiţiile menţionate anterior). Cu datele obţinute se construieşte o curbă, trecîndu-se în *abscisă* concentraţile substratului iar în ordonată vitezele corespunzătoare. Se obţine o curbă ca cea din fig. IV.9.

Scanned with OKEN Scanner

Pe curbă se disting: (a) o primă porţiune în care viteza iniţială variază linear cu concentraţia substratului:

$$V = \frac{d[S]}{dt} = K[S],$$

Tabelul IV.4

Efectul concentraţiei zaharozei asupra vitezei de hidroliză a ei sub acţiunea zaharazei

[S]	Viteza relativă*
0,1370	22,0
0,0995 ≃ 0,1	20,5
0,0676	19,0
0,0262	12,5
0,0136	9,0
0,0100	7,0
0,0079	6,0

*măsurată din rotaţia optică la 15 minute după adăugarea enzimei.

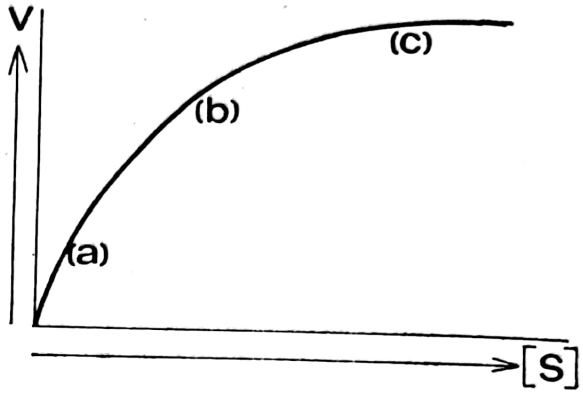


Fig. IV.9. Variaţia vitezei unei reacţii enzimatice în funcţie de concentraţia substratului.

(b) o porţiune, mai depărtată, în care viteza nu mai variază proporţional cu concentraţia substratului [S], căci:

$$V = \frac{d[S]}{dt} = \text{constantă}$$

(c) o porţiune intermediară în care variaţia vitezei se tasează: din apreciabilă ea devine progresiv nulă. În ansamblu, potrivit alurei sale, curba este un arc de hiperbolă echilaterală, din punct de vedere geometric.

Cum concordă faptele experimentale cu teoria potrivit căreia se admite că decurge procesul enzimatic? Această teorie a fost elaborată de Michaelis şi Menten.

4.5.1. TEORIA MICHAELIS-MENTEN

Ea are drept punct de plecare cele două ecuaţii menţionate anterior, care privesc formarea complexului ES şi descompunerea lui cu eliberarea lui E şi formarea produselor de reacţie:

$$(1)\ E + S \underset{K_2}{\overset{K_1}{\rightleftharpoons}} ES$$

$$(2)\ ES \xrightarrow{K_3} E + \text{produse}$$

Prima etapă în dezvoltarea teoriei Michaelis-Menten constă în caracterizarea cantitativă a reacţiei prin care se formează complexul ES.

Reacţia:

$$E + S \underset{K_2}{\overset{K_1}{\rightleftharpoons}} ES$$

poate să fie caracterizată, în principiu, cu ajutorul constantei de echilibru:

$$K_{ech} = \frac{K_1}{K_2}$$

Ea mai poate fi caracterizată însă şi cu ajutorul constantei de disociere a complexului:

$$ES \rightarrow E+S$$

$$K_{disoc} = \frac{[E] \cdot [S]}{[ES]} = \frac{K_2}{K_1}$$

De fapt, reacţia este caracterizată, în cadrul teoriei Michaelis-Menten, cu ajutorul constantei de disociere, numită constanta Michaelis (K_M).
Deci:

$$K_M = \frac{[E] \cdot [S]}{[ES]}$$

Etapa a II-a în teoria Michaelis-Menten se referă la exprimarea concentraţiei [E] a enzimei libere. Ea se poate exprima în funcţie de concentraţia $[E_T]$ a enzimei totale şi în funcţie de concentraţia enzimei legate cu substratul [ES]:

$$[E] = [E_T] - [ES]$$

înlocuind în expresia lui K_M, se obţine:

$$(1)\quad K_M = \frac{([ET] - [ES])\,[S]}{[ES]}$$

Relaţia (1) arată că dacă experimental se poate determina [ES], cunoscîndu-se $[E_T]$ şi [S] se poate determina şi constanta lui Michaelis. Însă [ES] nu se poate determina experimental, decît foarte rar. Pe de altă parte $[E_T]$ poate fi cunoscut numai cînd se foloseşte enzima pură, cristalizată; însă asemenea enzime sînt foarte puţine. Prin urmare, este imperios să se găsească o formă nouă a expresiei (1) în care să nu mai figureze mărimile [ES] şi $[E_T]$, care nu se pot determina experimental. Pentru aceasta, mai întîi se modifică expresia (1) rezolvîndu-se în favoarea lui [ES] şi apoi se ia în considerare variaţia vitezei în funcţie de [ES] adică ecuaţia $V = K_3\,[ES]$. Se obţin succesiv relaţiile:

$$(2)\quad ([E_T] - [ES])[S] = K_M[ES]$$

$$(3)\quad [E_T]S - [ES][S] = K_M[ES]$$

$$(4)\quad [E_T][S] = K_M[ES] + [S][ES]$$

$$(5)\quad [ES](K_M + [S]) = [E_T][S]$$

$$(6)\quad [ES] = \frac{[E_T] \cdot [S]}{K_M + [S]}$$

Etapa a III-a în dezvoltarea teoriei Michaelis-Menten constă în precizarea condiţiilor în care viteza procesului enzimatic atinge valoarea maximă. Ţinînd seama de ecuaţia vitezei:

$$(7)\quad V = K_3\,[ES]$$

şi făcînd consideraţia că atunci cînd toată enzima s-a combinat cu substratul, viteza procesului devine maximă:

$$(8)\quad V_{max} = K_3[E_TS] = K_3[ET]$$

Scanned with OKEN Scanner

Cu ajutorul ecuaţiilor (7) şi (8), înlocuind în ecuaţia (6) pe [ES] şi $[E_T]$, se obţine:

$$(9) \quad \frac{V}{K_3} = \frac{\frac{V_{max}}{K_3}[S]}{K_M+[S]}$$

Simplificînd cu K_3 (prin înmulţirea ambilor membri cu această constantă) se obţine:

$$(10) \quad V = \frac{V_{max}[S]}{K_M+[S]}$$

4.5.2. ECUAŢIA MICHAELIS

Relaţia precedentă (din formula 10) poartă numele de *ecuaţia Michaelis.* În afară de K_M, ecuaţia Michaelis cuprinde numai cantităţi ce se pot stabili experimental: [S], cantitatea de substrat pus în reacţie, V_{max}, viteza — constantă — a reacţiei atunci cînd se foloseşte un exces deajuns de mare de substrat.

Ecuaţia Michaelis (cu două constante: V_{max} şi K_M şi două variabile S şi V) este ecuaţia unui arc de hiperbolă echilaterală care pentru fiecare cuplu [E] şi [S] se suprapune perfect cu curba experimentală construită, aşa cum s-a spus cînd s-a început discutarea relaţiei dintre viteza de reacţie şi concentraţia substratului.

Deoarece teoria Michaelis-Menten conduce la curba experimentală, se poate socoti că reacţia enzimatică are loc potrivit presupunerilor care stau la baza teoriei şi care s-au enunţat.

4.5.3. VALOAREA CONSTANTEI MICHAELIS

Aceasta se poate obţine — fără calcule — dacă se cunoaşte V_{max}. Într-adevăr, K_M este egală cu concentraţia substratului [S], pentru care $V = \frac{V_{max}}{2}$, după cum rezultă din (10) înlocuind pe V cu $\frac{V_{max}}{2}$:

$$(11) \quad \frac{V_{max}'}{2} = \frac{V_{max}[S]}{K_M+[S]}; \text{ de unde:}$$

$$(12) \quad 2[S] = K_M+[S]$$

$$(13) \quad K_M = [S]$$

4.5.3.1. *Obţinerea efectivă a valorii* K_M. Potrivit definiţiei care s-a dat aici (cînd s-a precizat semnificaţia fizică), s-ar părea că obţinerea efectivă a valorii lui K_M ar trebui să se facă în felul următor: să se afle valoarea vitezei maxime a procesului, să se împartă la 2 această valoare şi apoi, servindu-se de curba care reprezintă variaţia vitezei în funcţie de concentraţia substratului, să se găsească concentraţia corespunzătoare a substratului. Aşa ar decurge operaţiile dacă s-ar putea calcula viteza maximă. Însă aceasta nu se poate face pe baza datelor experimentale căci la concentraţii mari de substrat viteza reacţiei enzimatice *tinde asimptotic* către V_{max}. Practic, ea nu ia nici-

Scanned with OKEN Scanner

odată o valoare fixă maximă (în sensul că creşteri semnificative ale concentraţiei substratului continuă să determine creşteri ale vitezei). Aşadar, curba: viteză — concentraţia substratului (din fig. IV.9), care se stabileşte pe baza datelor experimentale, nu permite să se afle V_{max} şi implicit, mărimea K_M.

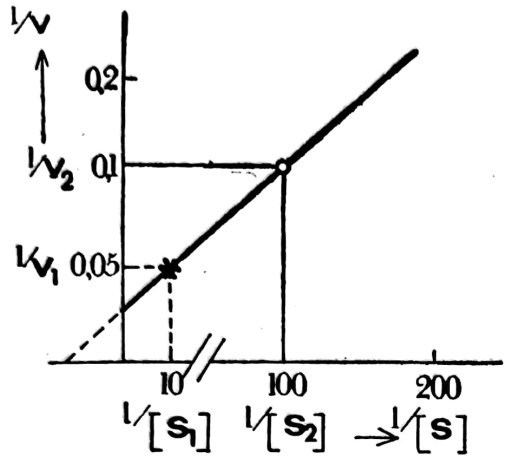


Fig. IV.10. Reprezentarea ecuaţiei Lineweaver-Burk.

Tabelul IV. 5

Relaţia dintre valoarea reciprocă a concentraţiei zaharozei şi valoarea reciprocă a vitezei sale de hidroliză sub acţiunea zaharazei

1/[S]	1/V
7,3	0,046
10	0,049 ≃ 0,05
14,8	0,053
38,2	0,080
73,5	0,111
100	0,143
127	0,167

Există totuşi posibilitatea să se calculeze valoarea efectivă a lui K_M, procedîndu-se în felul următor: din şirul de valori cuprinse în tabelul IV.4 şi care au servit la construirea curbei viteză-substrat cînd s-a urmărit viteza de hidroliză a zaharozei sub acţiunea zaharazei în funcţie de concentraţia zaharozei (substratului), se aleg două perechi de valori, spre exemplu:

$[S_1]=0,0995$ pentru care $V_1=20,5$ şi $[S_2]=0,0100$ pentru care $V_2=7,0$. Se calculează pentru fiecare reciprocele lor, respectiv $1/[S_1]$ şi $1/V_1$. Se găsesc valorile: $1/[S_1]=10,0$ şi $1/V_1=0,049$, precum şi $1/[S_2]=100$ şi $1/V_2=0,143$ (valori care figurează în tabelul IV.5).

Aceste valori se trec într-un grafic (fig. IV.10) ce cuprinde în abscise diverse valori $\frac{1}{[S]}$ (reciprocele valorilor [S] din tabelul precedent) şi în ordonate valorile $\frac{1}{V}$ (reciprocele valorilor V din tabelul precedent) (tabelul IV.5).

Unind între ele cele două puncte se obţine o linie dreaptă care intercepteză partea pozitivă a ordonatelor şi cea negativă a absciselor (vezi fig. IV.10).

Fiind o dreaptă care nu trece prin origine, ea are ecuaţia de formă generală:

$$y=ax+b.$$

Ecuaţia particulară a dreptei este:

$$(14)\ \frac{1}{V}=\frac{K_M}{V_{max}}\cdot\frac{1}{[S]}+\frac{1}{V_{max}}$$

4.5.4. ECUAŢIA LINEWEAVER-BURK

Expresia matematică precedentă (14) este cunoscută sub numele de ecuaţia Lineweaver-Burk. Comparînd această ecuaţie cu forma generală: $y=ax+b$, se vede că în noua ecuaţie variabilele sînt $\frac{1}{V}$ şi $\frac{1}{[S]}$ iar constantele:

Scanned with OKEN Scanner

$\frac{K_M}{V_{max}}$ şi $\frac{1}{V_{max}}$. Aşadar, mărimile V_{max} şi K_M figurează drept constante în ecuaţia dreptei. Pentru calcularea lor serveşte tocmai această ecuaţie care se scrie însă în forma următoare (rezultată din înmulţirea cu V_{max}):

$$V_{max} \frac{1}{V} = K_M \frac{1}{[S]} + 1$$

Dacă în această ecuaţie se anulează $\frac{1}{[S]}$, se obţine:

$$V_{max} \frac{1}{V} = 1; \text{ de unde: } \frac{1}{V} = \frac{1}{V_{max}}.$$

Aşadar, porţiunea pe partea pozitivă a ordonatei, cuprinsă între interceptul dreptei cu ordonata 1/V şi origine este $1/V_{max}$.

Dacă în ecuaţia de mai sus se anulează $\frac{1}{V}$, se obţine:

$$K_M \frac{1}{[S]} = -1, \text{ de unde: } \frac{1}{K_M} = -\frac{1}{[S]}$$

ceea ce înseamnă că porţiunea cuprinsă între interceptul dreptei cu partea negativă a abscisei $\frac{1}{[S]}$ şi origine este $1/K_M$. În felul acesta (pe baza unor deducţii matematice) se poate calcula V_{max} şi K_M în orice proces enzimatic. După cum s-a văzut, pentru a putea stabili aceste valori este suficient să se ia în consideraţie rezultatele a două experienţe făcute cu aceeaşi cantitate de enzimă şi cu două cantităţi deosebite din acelaşi substrat. Pentru fiecare experienţă trebuie să se măsoare însă precis viteza reacţiei enzimatice şi să se cunoască concentraţia substratului.

În tabelul IV.6 sînt menţionate — sub formă de concentraţii de substrat — valorile unor constante Michaelis pentru cîteva enzime acţionînd asupra unor substrate specifice.

Tabelul IV.6

Valori K_M pentru diverse enzime

Enzimă	Substrat	K_M (în mili moli/l)
Catalaza	Apă oxigenată	25,00
Hexokinaza	Glucoză	0,15
Anhidraza carbonică	Bioxid de carbon	9,00
Glutamatdehidrogenaza	Acid glutamic	0,12
Glutamatdehidrogenaza	NAD^+	0,025

Deoarece K_M reprezintă concentraţia substratului în reacţia care decurge cu viteza egală cu 1/2 V_{max}, înseamnă că cu cît K_M este mai mic, cu atît afinitatea enzimei pentru substrat este mai mare.

Scanned with OKEN Scanner

5. INFLUENŢA FACTORILOR DE MEDIU ASUPRA ACTIVITĂŢII ENZIMATICE

Datorită naturii lor proteice, enzimele sînt substanţe labile, susceptibile să fie uşor denaturate. Cum însă enzimele nu-şi păstrează însuşirea lor catalitică (de biocatalizatori) decît dacă nu sînt denaturate, se înţelege că orice factor de mediu sau substanţă care poate denatura proteina enzimatică determină astfel şi alterarea activităţii enzimatice. De fapt, influenţa diverşilor factori de mediu asupra unei enzime nu se poate aprecia decît studiindu-se modul în care factorul de mediu respectiv influenţează activitatea catalitică a enzimei.

În cele ce urmează se expun — pe scurt — influenţele principalilor factori de mediu asupra activităţii enzimatice.

5.1. INFLUENŢA TEMPERATURII

Prin creşterea temperaturii activitatea enzimatică creşte, deoarece o dată cu ridicarea temperaturii creşte energia cinetică a moleculelor reactante. Se observă chiar o *temperatură optimă*, la care reacţia enzimatică decurge cu viteza cea mai mare. Ridicînd însă temperatura dincolo de cea optimă, se constată că viteza procesului enzimatic scade repede, fiindcă la asemenea temperaturi (mai ridicate decît cea optimă) se rup legăturile chimice caracteristice structurii secundare a proteinei enzimatice şi aceasta se denaturează (fig. IV.11).

Ori, după cum s-a spus, desfiinţarea structurii proteinei enzimatice atrage şi pierderea activităţii catalitice. Aşadar, există numai anumite limite în care creşterea temperaturii determină creşterea vitezei de reacţie enzimatică.

Curba de variaţie a vitezei de reacţie enzimatică în funcţie de temperatură are înfăţişarea (asimetrică) din fig. IV.12, dovedind că la diverse temperaturi reacţia enzimatică nu se desfăşoară în acelaşi fel.

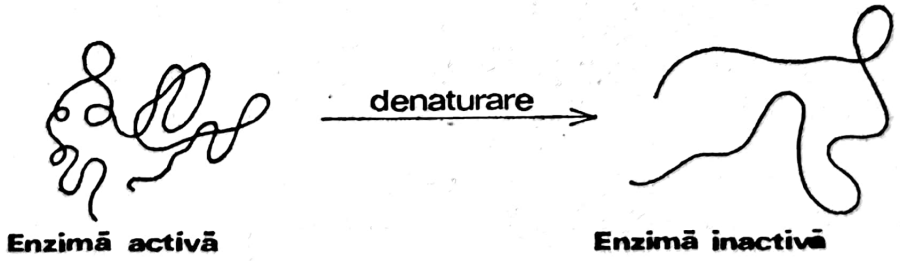


Fig. IV.11. Denaturarea proteinei enzimatice sub acţiunea temperaturii.

Pentru enzimele din organismele animale, temperaturile optime sînt în preajma temperaturii corporale; pentru enzimele plantelor, optimele de temperatură sînt cuprinse între 20 şi 30° iar pentru enzimele din microorganisme temperaturile optime sînt foarte ridicate; în apropierea p.f. al apei.

Scanned with OKEN Scanner

Trebuie remarcat însă că optimele de temperatură ale enzimelor sînt de fapt optime *aparente*, rezultate din concurența între două procese: cel de activare și cel de distrugere (prin denaturare) a enzimei (vezi a și b în fig. IV.12).

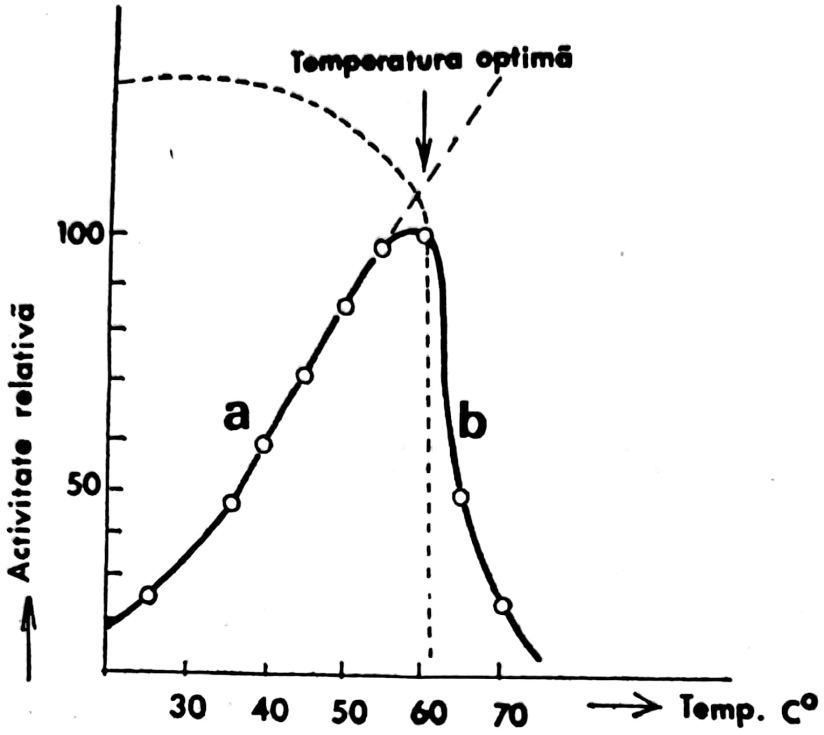


Fig. IV.12. Influența temperaturii asupra activității enzimatice.

5.2. INFLUENȚA pH-ului

Numeroase experiențe au demonstrat că enzimele prezintă și optime de pH (în afară de optim de temperatură); însă în acest caz optimele sînt *reale* (nu aparente, ca cele de temperatură). Se numește *pH optim* al unei enzime pH-ul mediului la care activitatea enzimei este cea mai mare.

În genere, activitatea diverselor enzime este optimă între valorile de pH 5,0 și 9,0. Totuși, unele enzime prezintă activitate maximă la o valoare de pH în afara acestui interval; spre exemplu, pepsina are pH optim 1,5. În tabelul următor sînt trecute pH-urile optime ale cîtorva enzime.

Din datele tabelului IV.7 reiese că pH-ul optim al unei enzime depinde atît de enzimă, cît și de substratul asupra căruia acționează enzima. Într-adevăr,

Tabelul IV.7

pH-ul optim al unor enzime

Enzima	Substratul	pH optim
Pepsina	Caseina	1,8
Pepsina	Ovalbumina	1,5
Pepsina	Hemoglobina	2,2
Amilaza din malț	Amidon	5,2
Amilaza salivară	Amidon	6,8
Tripsina	Hemoglobina	8,0
D-aminoacidoxidaza	D-alanina	9,0

Scanned with OKEN Scanner

enzimele fiind proteine sînt polielectroliţi şi gradul de ionizare al grupărilor acide şi bazice pe care le cuprind depinde de pH-ul mediului. Variaţiile ionizării acestor grupări determină schimbări conformaţionale moleculare care

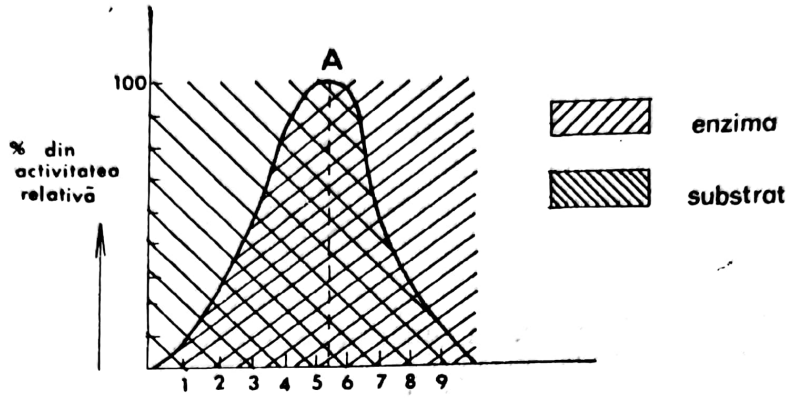


Fig. IV.13. Variaţia activităţii enzimatice în funcţie de pH.

atrag variaţii ale capacităţii enzimei de a se combina cu substratul, deci modificarea acţiunii enzimatice.

Trebuie remarcat însă că există şi situaţii în care două enzime cu aceeaşi specificitate dar provenind din două ţesuturi diferite au şi pH-uri optime deosebite. O asemenea situaţie se întîlneşte în cazul fosfatazei alcaline hepatice cu pH optim apropiat de 9 şi al fosfatazei acide din prostată cu pH optim 5.

Cînd şi substratul este electrolit sau polielectrolit, capacitatea de combinare a substratului este şi ea influenţată de pH. Spre exemplu, dacă enzima este un electrolit încărcat negativ (E^-) iar substratul este un electrolit încărcat pozitiv (S^+), unirea enzimei cu substratul are loc conform relaţiei:

$$E^- + S^+ \rightarrow ES$$

La valori mici de pH (în mediu acid) E^- îşi pierde sarcina, căci:

$$E^- + H^+ \rightarrow E.$$

La valori mari de pH (în mediu alcalin), S^+ îşi va pierde sarcina, căci:

$$S^+ + HO^- \rightarrow S$$

Prin urmare, valorile extreme de pH vor scădea concentraţiile efective de E^- şi S^+ şi deci viteza reacţiei. Deoarece singurele forme care pot interacţiona eficient sînt E^- şi S^+ înseamnă că numai la valorile pH care asigură starea ionică necesară combinării enzimei cu substratul, enzima îşi va putea exercita activitatea. Ţinînd seama de reprezentarea din fig. IV.13 aceasta se va petrece numai în regiunea de sub curba în formă de clopot. Pe grafic se observă un punct extrem (A) corespunzător concentraţiilor maxime de E şi S în stare ionică necesară combinării; pH-ul la care se realizează această situaţie este pH-ul optim.

5.3. INFLUENŢA IONILOR

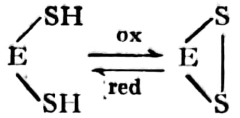
Ionii aflaţi în mediul reacţional influenţează activitatea enzimelor deoarece determină adesea fixarea apei în mai mare sau mai mică măsură pe moleculele proteinelor enzimatice.

Scanned with OKEN Scanner

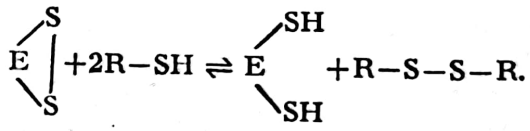
Hidratarea proteinei enzimatice influenţează conformaţia moleculelor ei şi, după cum s-a mai menţionat, activitatea depinde de conformaţia enzimei.

5.4. INFLUENŢA POTENŢIALULUI REDOX

Potenţialul redox al mediului influenţează starea grupărilor care pot suferi oxidări sau reduceri şi care intră în constituţia enzimelor. Asemenea influenţă se exercită, în special, asupra grupărilor —SH. Modificări de genul:



determină schimbări conformaţionale ale enzimei şi antrenează astfel modificări ale activităţii enzimatice. În general, oxidarea grupărilor SH antrenează inactivarea enzimelor şi de aceea pentru menţinerea activităţii se adaugă uneori în mediu reductori convenabili de felul cisteinei sau glutationului care, fiind compuşi sulfhidrilici (R—SH), reduc grupul S—S inactiv al enzimei iar ei se oxidează trecînd în forma disulfurică:



5.5. INFLUENŢA PRESIUNII ŞI A RADIAŢIILOR

Enzimele supuse la presiuni foarte mari (de ordinul a 18 000 atmosfere) îşi pierd ireversibil acţiunea lor catalitică. Acelaşi efect îl au şi radiaţiile energice: razele ultraviolete, radiaţiile β, razele X. Efectul radiaţiilor se datoreşte în parte oxidării unor grupări funcţionale (de felul grupărilor —SH) din constituţia enzimei de către peroxizii şi radicalii liberi de tipul HO formaţi din apă sub acţiunea radiaţiilor cu energie mare.

6. EFECTORII ENZIMATICI

Sub numele de efectori enzimatici se înţelege ansamblul compuşilor chimici care intervin în modificarea mecanismului activităţii enzimatice. Studiul efectorilor enzimatici prezintă un dublu interes: în primul rînd, un interes fiziologic pentru că anumiţi efectori joacă rol biologic foarţe important; în special, în reglarea metabolismelor şi, în al doilea rînd, un interes biochimic pentru că ei permit furnizarea unor date preţioase în legătură cu modul în care intervin enzimele.

Potrivit mecanismului lor de acţiune, există mai multe tipuri de efectori enzimatici. În cele ce urmează sînt prezentate cele mai importante date cu privire la principalii efectori enzimatici.

6.1. ACTIVATORII

Potrivit denumirii, activatorii sînt substanţe care „ajută" enzimele să-şi desfăşoare activitatea lor catalitică, prin acţiunea numită activare. Există mai multe modalităţi de activare a unei enzime:

Scanned with OKEN Scanner

6.1.1. ACTIVAREA PRIN IONI

Unii ioni metalici (Mg^{2+}, Mn^{2+}, Zn^{2+}, Co^{2+}) şi unii anioni (Cl^-) acţionează, fiecare, drept activatori specifici pentru anume enzime. În absenţa lor, enzimele respective nu mai acţionează asupra substratelor corespunzătoare. Spre exemplu, dacă se dializează un preparat de amilază salivară, aceasta îşi pierde activitatea specifică de a hidroliza amidonul la pH-ul său optim, 6,8. Activitatea este însă recîştigată prin adaos de ioni Cl^- (din NaCl), ceea ce denotă că aceşti anioni sînt activatorii enzimei.

Influenţa ionilor Cl^- asupra acţiunii amilazei salivare se poate urmări şi în graficul din fig. IV.14. Activarea pare nespecifică deoarece şi alţi anioni (Br^-, I^-, NO_3^-, ClO_3^-) exercită acţiuni asemănătoare. Totuşi, numai sub influenţa ionilor Cl^- activitatea amilazei salivare este maximă.

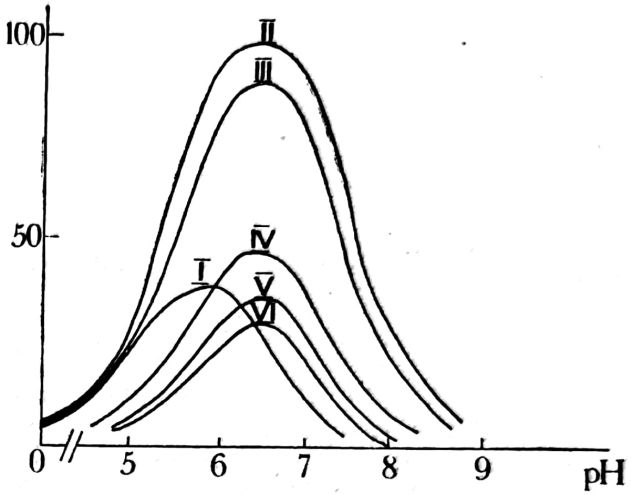


Fig. IV.14. Influenţa anionilor asupra activităţii amilazei salivare (I — fără activator, II — cu NaCl, III — cu NaBr, IV — cu KI, V — cu $NaNO_3$ şi VI — cu $KClO_3$).

6.1.2. ACTIVAREA PRIN TRANSFORMAREA UNEI PROENZIME ÎN ENZIMĂ

Un al doilea tip de activatori este constituit de acele substanţe care transformă o proenzimă inactivă în enzimă activă, deblocînd grupări reactive din molecula proenzimei. Se spune că aceşti activatori acţionează prin „demascare". Spre exemplu, tripsinogenul este o proenzimă inactivă proteolitică,

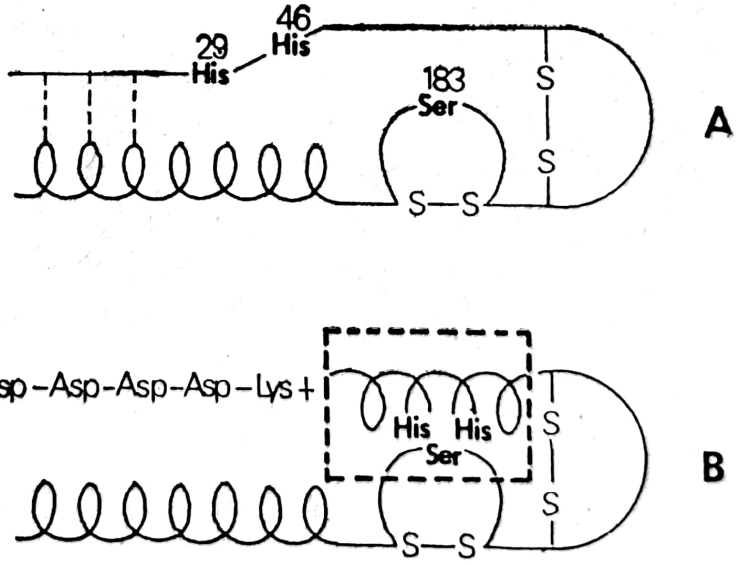


Fig. IV.15. Schema structurii tripsinogenului (A) şi tripsinei (B).

aflată în sucul pancreatic. Cînd însă acesta ajunge în intestinul subţire, enterochinaza (enzimă secretată de mucoasa intestinală) îndepărtează din tripsinogen un hexapeptid terminal determinînd o rearanjare a moleculei (fig. IV.15).

Scanned with OKEN Scanner

În fig. IV.15 se poate observa că cele două resturi de histidină (29 şi 46) se plasează în faţa serinei (183) constituindu-se astfel centrul activ al tripsinei.

Acest gen de activare se întîlneşte şi la alte enzime proteolitice; spre exemplu, la pepsinogen care este demascat de ionii H^+ sau de către însăşi pepsina din stomac, pentru a trece în pepsină activă.

6.1.3. ACTIVAREA PRIN ANTIINHIBIŢIE

Acest gen de activare constă în înlăturarea unei substanţe care împiedică desfăşurarea reacţiei enzimatice, numită inhibitor. Spre exemplu, cianurile alcaline activează ureaza inhibată de sărurile de cupru.

Un caz particular al acestui tip de activare este următorul:

6.1.3.1. *Activarea prin intervenţie asupra subunităţilor enzimatice.* Ea poate fi ilustrată în cazul proteinkinazelor care catalizează reacţia:

$$\text{Proteină} + \text{ATP} \rightarrow \text{proteină}-\text{P} + \text{ADP}.$$

Radicalul fosforic care se uneşte cu proteina se combină, prin esterificare, cu serina sau treonina din lanţul polipeptidic al proteinei. Principalele substrate ale proteinkinazelor (proteina din reacţia precedentă) sînt: histonele, protaminele, caseina, fosforilkinaza.

Majoritatea proteinkinazelor sînt activate intens de către AMP-ul ciclic. Mecanismul de activare poate fi urmărit în schema din fig. IV.16.

După cum rezultă din figura respectivă, proteinkinaza este formată din două subunităţi: una catalitică (care cuprinde situsul activ) şi una reglatoare (care cuprinde un situs de fixare a AMP-ului ciclic). Enzima în întregime este inactivă din cauză că centrul activ este mascat. Dacă se adaugă însă în mediu activatorul (c-AMP), acesta se combină cu subunitatea reglatoare şi o detaşează de cealaltă unitate a cărui situs activ devine astfel accesibil substratelor specificate. Este de notat că întreg procesul schematizat în fig. IV.16 este reversibil.

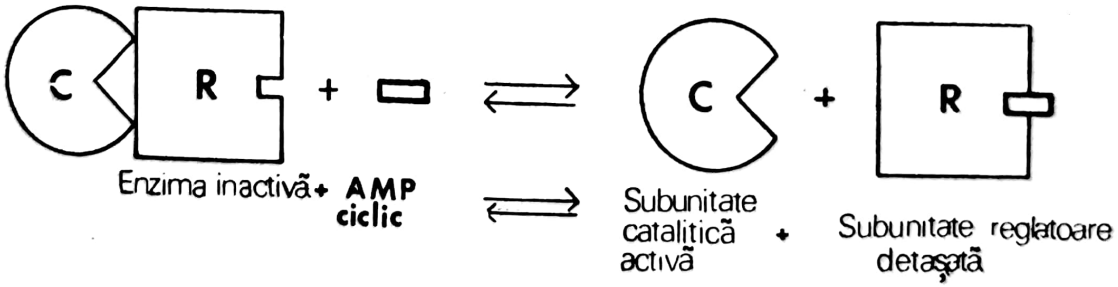


Fig. IV.16. Activarea unei proteinkinaze de către AMP-ul ciclic.

6.1.4. ACTIVAREA PRIN PROTEJAREA ENZIMEI

Toţi compuşii care protejează enzimele împotriva agresorilor chimici (spre exemplu, oxidanţii pentru enzimele care cuprind cisteină în centrul lor activ) sînt consideraţi activatorii enzimelor respective. Cei mai frecvenţi activatori de acest tip sînt cisteina însăşi şi glutationul. Asemenea compuşi reducători activează papaina, cu grupări —SH în centrul activ şi care este inactivată uşor de oxidanţi.

Scanned with OKEN Scanner

6.2. INHIBITORII

Inhibitorii sînt substanţe care influenţează negativ desfăşurarea activităţii enzimatice, determinînd scăderea vitezei procesului, eventual pînă la zero. Acţiunea inhibitorilor se numeşte inhibiţie.

Nu orice substanţă care împiedică o reacţie enzimatică este inhibitor; spre exemplu, o substanţă care se combină cu substratul făcîndu-l inapt să reacţioneze. În acest caz viteza este încetinită din cauza lipsei substratului. Se înţelege deci că sînt inhibitori — în sensul în care interesează — numai substanţele care acţionează asupra enzimelor. Totuşi, o substanţă sau un agent (ex.: temperatura) care denaturează proteina enzimatică nu trebuie socotită inhibitor. Sînt inhibitori numai substanţele care au acţiuni specifice asupra enzimelor influenţînd negativ cinetica procesului enzimatic.

Există două feluri de inhibitori: *competitivi*, cei care acţionează asupra enzimei în concurenţă (competiţie) cu substratul şi *necompetitivi*, cei care acţionează independent de substrat.

6.2.1. INHIBIŢIA COMPETITIVĂ

Inhibiţia competitivă se caracterizează prin aceea că viteza reacţiei enzimatice desfăşurată în prezenţa unui inhibitor competitiv depinde de proporţia dintre cantităţile de substrat şi de inhibitor din sistem. Într-adevăr, la adăugarea inhibitorului într-o proporţie apreciabilă, viteza procesului enzimatic desfăşurat în absenţa lui scade; prin mărirea concentraţiei substratului viteza iniţială se restabileşte şi fenomenul se poate repeta alternativ prin mărirea, pe rînd, a concentraţiei substratului sau a concentraţiei inhibitorului.

Dacă unui sistem în care enzima a fost inhibată de un inhibitor competitiv i se adaugă substrat normal pînă cînd viteza procesului enzimatic devine maximă, această viteză este aceeaşi cu viteza maximă care se obţine în absenţa inhibitorului.

Substanţele apte să inhibe competitiv acţiunea unei enzime sînt, în genere, analoge din punct de vedere chimic sau structural cu substratul normal al enzimei.

În procesele enzimatice care pot suferi uşor inhibiţie competitivă enzimele respective nu sînt suficient de specifice; ele se pot combina cu inhibitorii competitivi ca şi cînd aceştia ar fi substratele lor naturale (normale).

Faptul că inhibitorul este analog — din punct de vedere structural — cu substratul şi faptul că enzima este suficient de specifică, fac ca enzima să se unească cu inhibitorul formînd un complex, *enzimă-inhibitor* (EI). Acest complex nu contribuie la reacţia enzimatică, ci dimpotrivă, el scade cantitatea de enzimă disponibilă pentru formarea complexului enzimă-substrat (ES), scăzînd în acest fel viteza reacţiei, deoarece $V = K\,[ES]$.

Situaţia într-un sistem în care se află un inhibitor competitiv poate fi caracterizată de ecuaţiile:

$$E + S \rightleftharpoons ES \quad \text{şi} \quad E + I \rightleftharpoons EI$$

Constantele de disociere ale produselor complexe ES şi EI sînt respectiv: K_M şi K_I, date de expresiile:

$$K_M = \frac{[E][S]}{[ES]} \quad \text{şi} \quad K_I = \frac{[E][I]}{[EI]}$$

Scanned with OKEN Scanner

Dacă se împarte membru cu membru ecuaţiile care definesc constantele K_M şi K_I, se obţine:

$$\frac{K_M}{K_I} = \frac{\frac{[E][S]}{[ES]}}{\frac{[E][I]}{[EI]}} = \frac{[S][EI]}{[I][ES]}$$

de unde:

$$\frac{[EI]}{[ES]} = \frac{K_M}{K_I} \cdot \frac{[I]}{[S]} \quad \text{sau} \quad \frac{[EI]}{[ES]} = K \frac{[I]}{[S]}$$

În această ultimă expresie [EI]/[ES] reprezintă o *măsură a gradului de inhibiţie*: cu cît cantitatea de complex *EI* este mai mare ca cea de complex *ES*, cu atît reacţia enzimatică este inhibată mai puternic. Însă, după cum se vede din ultima reacţie, valoarea raportului [EI]/[ES] depinde de proporţia dintre variabilele [I] şi [S]: este mai mare cînd proporţia de inhibitor faţă de substrat este mai mare şi este mai redusă cînd proporţia de inhibitor faţă de substrat este mai mică.

Această concluzie corespunde perfect constatărilor experimentale, fapt care îndreptăţeşte să se considere că teoria inhibiţiei competitive este corectă.

Dezvoltarea matematică a principiului pe care se bazează teoria inhibiţiei competitive conduce la concluzia că în prezenţa inhibitorului competitiv ecuaţia Lineweaver-Burk a reacţiei enzimatice respective, devine:

$$(1) \quad \frac{1}{V} = \frac{K_M\left(1 + \frac{[I]}{K_I}\right)}{V_{max}} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}}$$

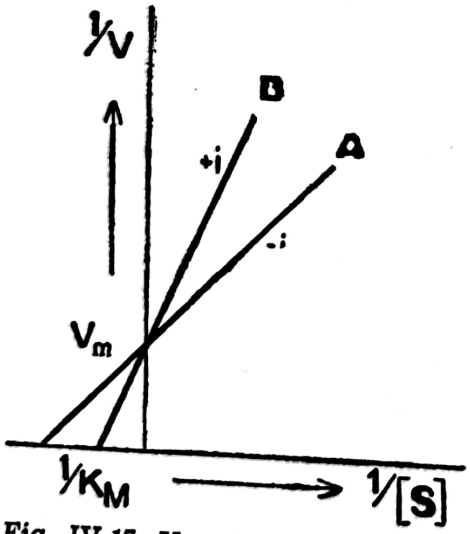


Fig. IV.17. V_m şi K_M în inhibiţia competitivă.

în absenţa unui asemenea inhibitor, era:

$$\frac{1}{V} = \frac{K_M}{V_{max}} \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}}$$

Dacă într-un sistem de coordonate: 1/[S] şi 1/V se înscrie procesul neinhibat prin dreapta A din grafic, se poate înscrie şi procesul inhibat competitiv prin dreapta B (fig. IV.17). Pentru aceasta se stabilesc interceptele pe axa 1/V şi 1/[S] conform aceloraşi principii prin care s-a înscris şi interceptele pentru dreapta A. Anulînd pe 1/[S] şi pe 1/V din ecuaţia (1) se obţine:

$$\text{cînd } 1/[S]=0; \quad \frac{1}{V} = \frac{1}{V_{max}}$$

$$\text{cînd } 1/V=0; \quad \frac{1}{[S]} = \frac{-1}{K_M\left(1 + \frac{[I]}{K_I}\right)}$$

$$\text{sau} = \frac{1}{[S]} = \frac{-1}{K_M} \cdot \frac{1}{1 + \frac{[I]}{K_I}}$$

Scanned with OKEN Scanner

Se obţine deci: $1/V = 1/V_{max}$, ca şi în procesul neinhibat dar în acest caz $1/K_M$ este mai mic decît 1/[S] din procesul neinhibat; adică $K_M > [S]$ din procesul neinhibat. Cu alte cuvinte, în prezenţa inhibitorului competitiv se poate restabili viteza maximă dar folosindu-se o cantitate mai mare de substrat.

6.2.2. INHIBIŢIA NECOMPETITIVĂ

În acest caz, inhibiţia este cu atît mai puternică, cu cît cantitatea de inhibitor necompetitiv este mai mare în raport cu cantitatea de enzimă (nu în raport cu cantitatea de substrat, ca la inhibiţia competitivă). Inhibitorii necompetitivi sînt în general unii ioni metalici. Inhibiţia necompetitivă nu este influenţată de raportul dintre cantitatea de inhibitor şi cea de substrat (spre deosebire de inhibiţia competitivă). Viteza maximă a reacţiei la care se poate ajunge este mai mică în prezenţa inhibitorului necompetitiv decît în absenţa lui (s-a văzut că în cazul inhibiţiei competitive se poate ajunge în prezenţa inhibitorului la viteza maximă a procesului enzimatic neinhibat) (fig. IV.18). În cazul inhibiţiei necompetitive, enzima are afinitate pentru inhibitor formînd complexul EI:

$$E + I \rightleftharpoons EI$$

Enzima se combină cu substratul potrivit afinităţii sale normale, indiferent dacă este sau nu este combinată cu inhibitorul. Dar afinitatea enzimei pentru substratul său este dată de K_M. Deci:

$$E + S \rightleftharpoons ES \text{ şi } K_M = \frac{[E][S]}{[ES]}$$

Inhibitorul se combină şi cu ES formînd complexul ESI:

$$I + ES \rightleftharpoons ESI$$

Formarea acestui complex este posibilă peutrn că inhibitorul necompetitiv se combină cu alte grupări (se fixează în alte locuri) din enzimă, deosebite de centrul activ unde se fixează substratul. Complexul *ESI* este inactiv, în sensul că nu dă naştere la produsele normale ale reacţiei. De asemenea, complexul *EI* este inactiv.

Din cauza formării acestor complexe (EI şi ESI), o parte din cantitatea de enzimă, care în condiţii normale s-ar afla combinată numai cu S, este ineficientă pentru formarea produselor de reacţie.

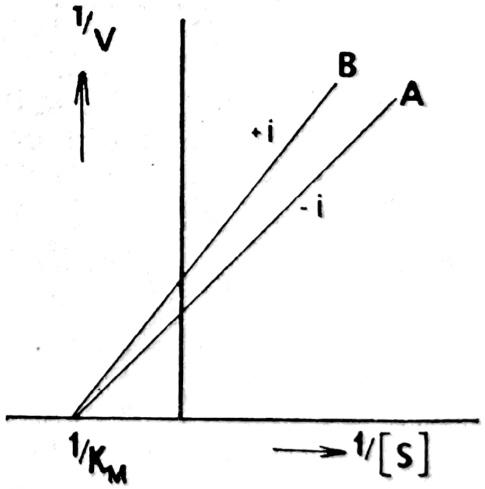


Fig. IV.18. V_m şi K_M în inhibiţia necompetitivă.

Într-adevăr, în produse se transformă numai complexul ES. Aceasta înseamnă că deşi procesul enzimatic între substrat şi enzimă decurge normal, conform aceleiaşi afinităţi (acelaşi K_M), viteza lui nu mai poate fi V_{max}, ca în cazul inhibiţiei competitive, căci o parte din enzimă este *blocată* în complexele EI şi ESI (vezi graficul din fig. IV.18).

Scanned with OKEN Scanner

Dezvoltarea matematică a postulatelor care stau la baza teoriei inhibiției necompetitive, duce la concluzia că în prezența inhibitorului necompetitiv, ecuația Lineweaver-Burk este dată de expresia:

$$(2)\ \frac{1}{V} = \left(1 + \frac{[I]}{K_I}\right)\left[\frac{K_M}{V_{max}} \times \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}}\right]$$

Interceptele cu axele 1/[S] și 1/V se calculează conform principiului cunoscut prin anularea pe rînd a variabilelor. Așadar cînd,

$$\frac{1}{[S]} = 0;\quad \frac{1}{V} = \left(1 + \frac{[I]}{K_I}\right)\frac{1}{V_{max}}$$

deci 1/V este mai mare decît în cazul procesului neinhibat $\left(= \frac{1}{V_{max}}\right)$, ceea ce înseamnă că V_{max} este mai mic în procesul inhibat necompetitiv.

Cînd:

$$\frac{1}{V} = 0;$$

$$\left(1 + \frac{[I]}{K_I}\right)\frac{K_M}{V_{max}} \cdot \frac{1}{[S]} = -\left(1 + \frac{[I]}{K_I}\right)\frac{1}{V_{max}}$$

de unde:

$$\frac{1}{[S]} = -\frac{1}{K_M} \quad \text{sau} \quad \frac{1}{K_M} = -\frac{1}{[S]}$$

Deci, în cazul inhibiției necompetitive enzima se unește cu substratul conform unei aceleiași afinități (același K_M) dar nu se poate ajunge niciodată la viteza maximă a procesului neinhibat.

6.2.3. INHIBIȚIA PRIN SUBSTRAT

Cînd într-un mediu de reacție enzimatic se găsesc concentrații foarte mari de substrat, în afară de complexul activ ES se poate forma și un complex cuprinzînd mai mult substrat, ESS. Acesta este inactiv sau foarte puțin activ. În asemenea condiții, efectul inhibitor al substratului este cu atît mai puternic cu cît substratul se află în cantitate mai mare; de aceea, acest gen de inhibiție enzimatică se numește „inhibiție prin substrat".

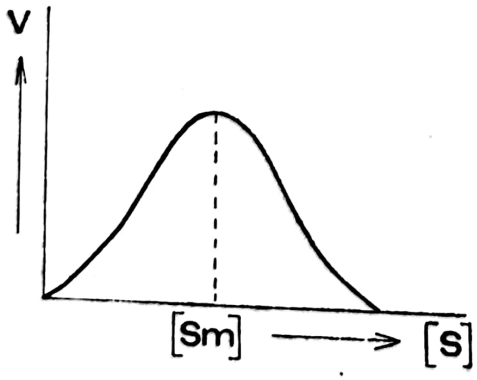


Fig. IV.19. Variația vitezei de reacție enzimatică în cazul inhibiției prin exces de substrat.

Fig. IV.20. Inhibiția prin exces de substrat.

În cazul inhibiției prin substrat, variația vitezei de reacție enzimatică în funcție de concentrația substratului nu mai are loc conform ecuației Michaelis-Menten, reprezentată grafic printr-un arc de hiperbolă echilaterală, ci la concentrații mari de substrat curba coboară rezultînd o curbă în formă de clopot (fig. IV.19). După cum rezultă din figură, există o concentrație

Scanned with OKEN Scanner

optimă, S_m, de substrat pentru care procesul se desfăşoară cu cea mai mare viteză.

În cazul excesului de substrat se poate admite că acesta ajunge să ocupei în mod anormal, regiuni din sistemul activ, împiedicînd producerea reacţie, (fig. IV. 20).

6.2.4. INHIBIŢIA PRIN PRODUŞII DE REACŢIE

Fenomenul pare paradoxal dar se explică uşor; produsul de reacţie se aseamănă adesea, din punct de vedere structural, cu substratul. Se înţelege — în aceste condiţii — că acumulîndu-se produsul de reacţie în mediu, el se comportă, într-un anumit grad, ca un inhibitor competitiv al enzimei. Bineînţeles, acest proces ar putea avea un rol reglator; dacă se acumulează un compus, produs într-o reacţie enzimatică, el tinde să-şi frîneze propria-i formare. Astfel, glucoza este un inhibitor competitiv al glucozo-6-fosfatazei care catalizează reacţia:

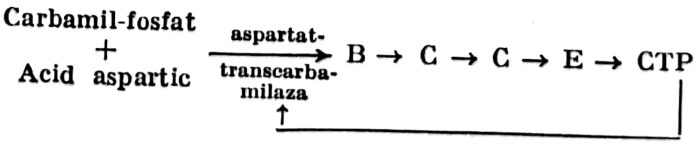
$$\text{glucozo-6-P} + H_2O \rightarrow \text{glucoză} + H_3PO_4$$

7. EFECTORII ALOSTERICI

Cei mai importanţi efectori enzimatici sînt cei alosterici deoarece ei participă la reglarea activităţii metabolice a enzimelor celulare. Interpretarea efectului alosteric a fost dată de Monod, Changeux şi Wyman în 1965 deşi primele observaţii relative la acest efect sînt mult mai vechi. Într-adevăr, încă din 1940 Dische a remarcat că adăugîndu-se acid-3-fosfogliceric globulelor roşii se inhibă formarea de glucozo-6-fosfat. Ori, se ştie că atît glucozo-6-fosfatul cît şi acidul-3-fosfogliceric aparţin aceleiaşi secvenţe metabolice de degradare a glucidelor, glicolizei (în glicoliză glucozo-6-fosfatul se formează cu cîteva reacţii mai înainte de acidul 3-fosfogliceric).

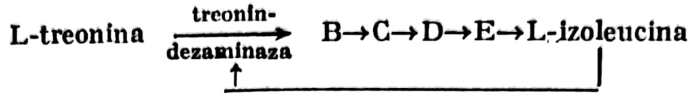
7.1. INHIBITORII ALOSTERICI

Novick şi Szilard adăugînd triptofan într-un mediu care cuprindea bacterii de tip Escherichia coli au constatat că biosinteza acestui aminoacid se opreşte imediat. Pentru explicarea cauzei s-au făcut, în primul rînd, cercetări asupra bacteriilor deoarece se ştie că celulele lor sînt în măsură să sintetizeze numeroşi metaboliţi necesari animalelor superioare, pornind de la compuşi foarte simpli şi folosind şiruri întregi de reacţii metabolice uşor de urmărit sau analizat. Astfel, Gerhardt şi Pardee au studiat lanţul de reacţii metabolice care pornesc de la carbamilfosfat şi acid aspartic, conducînd la constituirea citidîntrifosfatului (CTP). Acest şir de reacţii este lung fiind format din numeroase etape intermediare, analizate şi lămurite deplin. În urma cercetărilor efectuate autorii au ajuns la concluzia că adaosul de CTP inhibă propria sa formare şi — lucru surprinzător — inhibiţia este exercitată asupra primei enzime care catalizează cea dintîi reacţie a şirului metabolic menţionat. Această enzimă este aspartat-transcarbamilaza care catalizează reacţia dintre acidul aspartic şi carbamil-fosfat:



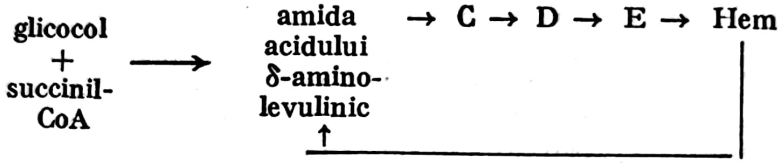
Este de remarcat că aspartat-transcarbamilaza este activată de ATP.

Bacteria Escherichia coli sintetizează şi L-izoleucina pornind de la L-treonină printr-un lung şir metabolic. Şi de data aceasta se constată că L-izoleucina (produsul final) este un inhibitor al primei enzime intervenind în lanţul metabolic, treonin-dezaminaza:



Această inhibiţie este foarte specifică deoarece D-izoleucina nu are efect inhibitor asupra treonin-dezaminazei.

De asemenea, sinteza hemului, pornindu-se de la glicocol şi succinil-CoA începe (vezi capitolul XIV, privind biochimia sîngelui), cu sinteza acidului δ-aminolevulinic. Enzima care catalizează această reacţie este δ-aminolevulinat-sintetaza. La microorganismul Rhodopseudomonas sferoides hemul inhibă această enzimă:



Efectorii din exemplele citate: CTP, L-izoleucina şi hemul prezintă trei însuşiri caracteristice:

(1) Structurile lor sînt foarte îndepărtate de cele ale substratelor corespunzătoare enzimelor inhibate;

(2) acţiunea celor trei inhibitori este foarte specifică în sensul că alţi compuşi cu structuri asemănătoare nu exercită nici un fel de acţiune;

(3) fiecare efector inhibă prima enzimă specifică din şirul metabolic prin care el se biosintetizează. Această inhibiţie particulară poartă numele de *retroinhibiţie* sau inhibiţie prin „feed-back".

S-a demonstrat că, în fiecare caz, inhibitorul nu se fixează în situsul activ al enzimei pe care o inhibă (ca în cazul inhibiţiei competitive), ci într-un centru separat numit „situsul reglator de inhibiţie", apropiat de situsul activ. Existenţa unui alt centru spaţial (allo=alt, steros=corp spaţial) de fixare, împreună cu prima proprietate citată [sub punctul (1)] au făcut ca inhibitorii respectivi să se numească „inhibitori alosterici" iar enzimele care suferă acţiunea lor s-au numit „enzime alosterice".

7.2. ACTIVATORII ALOSTERICI

Activatorii alosterici înlesnesc trecerea unei enzime din formă inactivă în formă activă. Spre exemplu, fosforilaza *b* (inactivă) se transformă în fosforilaza *a* (activă) sub acţiunea AMP-ului ciclic, piruvat carboxilaza este activată de acetil-CoA, acetil-CoA-carboxilaza este activată de citrat care menţine enzima sub formă de polimer. În genere, intervenţia activatorului alosteric în aceste cazuri constă în înlăturarea unui inhibitor al enzimei alosterice respective.

În alte cazuri, foarte frecvente dealtfel, efectorul alosteric intervine asupra unei enzime în mod selectiv orientîndu-i acţiunea spre un anume

Scanned with OKEN Scanner

substrat şi inactivînd-o faţă de alte substrate. O asemenea situaţie se întîlneşte la ribonucleozido-fosfat-reductaza care prezintă în funcţie de natura efectorilor ce acţionează asupra ei, o stare inactivă (1 în fig. IV.21) şi trei stări reactive diferite faţă de CDP şi UDP sau GDP şi ADP.

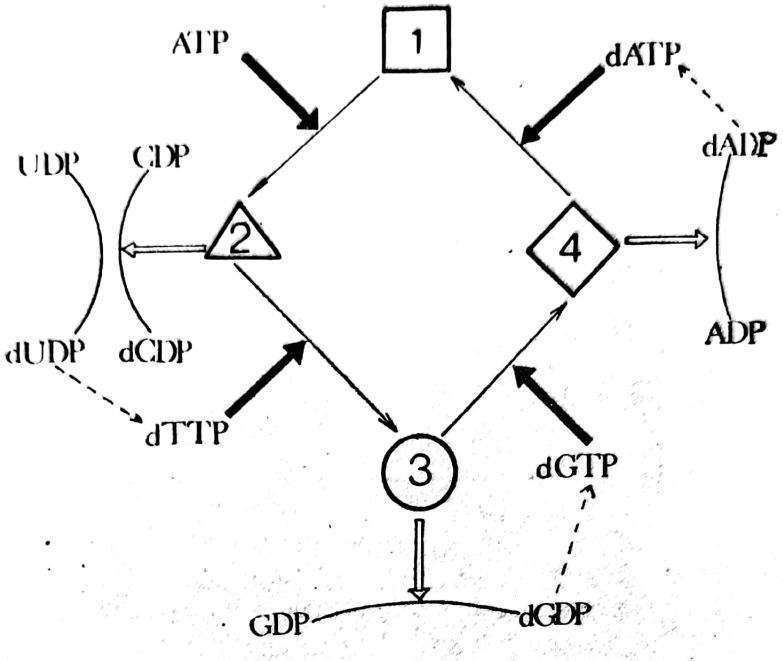


Fig. IV.21. Schema activării ribonucleozid-difosfat-reductazei de către ATP, dTTP, dGTP, dATP-ul acţionează ca inhibitor al enzimei (săgeţile → indică acţiunea efectorilor alosterici. Săgeţile ⇒ indică acţiunile enzimatice).

Din exemplul citat se poate conchide că o astfel de enzimă alosterică este în măsură să aisgure singură, reglarea automată a biosintezei tuturor dezoxi-ribonucleozidelor trifosforilate necesare sintezei de ADN.

7.3. CINETICA ENZIMELOR ALOSTERICE

Legea Michaelis presupune existenţa unui singur centru activ pentru fixarea substratului pe enzimă. Există însă numeroase enzime care pot fixa mai multe molecule de acelaşi fel de substrat în mai multe centre active pe aceeaşi moleculă de enzimă. Aceste enzime cu situsuri active multiple nu pot fi considerate ca rezultînd dintr-o simplă suprapunere a mai multor enzime cu cîte un singur centru activ fiecare, deoarece constantele Michaelis ale lor nu sînt identice (ca în cazul unei enzime michaeliene a cărei cinetică respectă legea Michaelis). Se consideră — şi s-a dovedit — că în cazul enzimelor cu mai multe centre active se exercită un efect cooperativ între moleculele de substrat fixate pe aceeaşi enzimă; însăşi situsurile active sînt cooperative. Efectul cooperativ se manifestă, în special, prin aceea că fixarea primei molecule de substrat induce o modificare conformaţională a celorlalte centre active, ceea ce le modifică afinitatea pentru substratele respective.

Efectul cooperativ al centrelor active poate fi pus uşor în evidenţă prin trasarea curbelor de variaţie a vitezei procesului enzimatic în funcţie de concentraţia substratului. În cazul unei enzime michaeliene se obţine, după cum s-a mai menţionat, un arc de hiperbolă echilateră iar în cazul unei enzime

cu mai multe situsuri cooperative se obţine o curbă sigmoidă, asimptotică la valoarea 1 (fig. IV.22). Alura acestor curbe arată că în cazul enzimei michaeliene fixarea primelor molecule de substrat se face foarte uşor iar saturarea completă a moleculelor enzimei necesită concentraţii de substrat din ce în

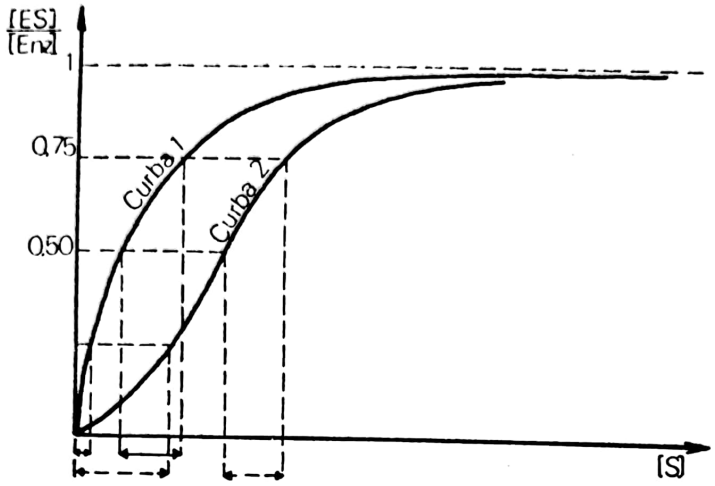
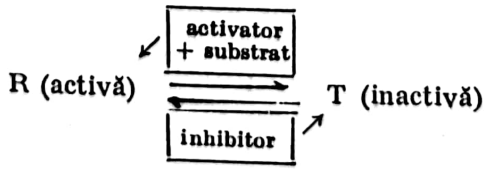


Fig. IV.22. Curbele de saturaţie ale unei enzime michaeliene (1) şi ale unei enzime alosterice cu situsuri cooperative (2).

ce mai mari. În cazul unei enzime cu situsuri cooperative, saturarea completă este tot atît de dificilă ca şi pentru enzima michaeliană însă fixarea primelor molecule de substrat necesită creşterea concentraţiei substratului în măsură mult mai mare. Într-adevăr, pînă la atingerea valorilor de 50—75% saturaţie a enzimei cu substrat (vezi fig. IV.22), pentru enzima cu situsuri cooperative sînt necesare cantităţi de substrat sensibil mai mari.

Efectul cooperativ, care este un aspect particular al fenomenului de alosterie, se manifestă şi cînd enzima nu fixează numai molecule de substrat ci molecule de substrat şi de efectori alosterici (activatori sau inhibitori). În aceste cazuri, enzimele alosterice posedă două tipuri de centre numite, respectiv: centrul sau *situsul activ* în care se fixează substratul şi *situsul reglator* în care se fixează efectorul.

Potrivit modelului descris de Monod, Wyman şi Changeux, o enzimă alosterică este un oligomer constituit din mai multe subunităţi numite *protomeri* şi asociate între ele, astfel încît molecula oligomeră (fig. IV. 23) să posede cel puţin un centru de simetrie. Fiecare protomer cuprinde un singur centru activ, catalitic (c) pentru legarea substratului şi cîte un centru pentru fixarea fiecărui tip de efectori: activator (a) şi inhibitor (i). Enzimele alosterice — constituite din protomeri — pot exista în două stări conformaţionale distincte, aflate în echilibru: R (relaxată), reactivă şi T (tensionată), inactivă.



Scanned with OKEN Scanner

Simetria oligomerului este păstrată atît în forma R, cît şi în forma T. Fixarea pe forma R a substratului şi activatorului determină stabilizarea moleculei oligomerului în această stare; toţi promotorii sînt transformaţi din punct de vedere conformaţional, simultan, astfel încît afinitatea lor pentru

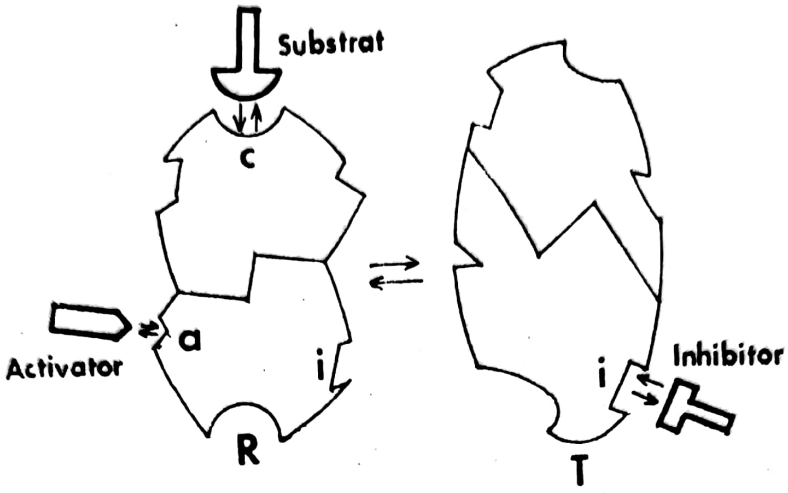


Fig. IV.23. Modelul Monod, Wyman şi Changeux al enzimelor alosterice.

substrat creşte [curba (+) în fig. IV. 24]. Din fig. IV. 24 rezultă că alura curbei sigmoide tinde către cea a arcului de hiperbolă, caracteristică enzimelor michaeliene. Acest fapt dovedeşte că activatorii alosterici au tendinţa să suprime efectul cooperativ; situsurile de legătură ale substratelor reacţionînd aproape independent, ca cele din enzimele michaeliene.

Fixarea pe forma T a inhibitorului alosteric determină accentuarea efectului cooperativ [curba (—) din fig. IV. 24].

Curbele sigmoidale admit pentru exprimarea variaţiei vitezei în funcţie de concentraţia substratului, ecuaţia Hill:

$$\frac{v}{1-v} = K[S]^{n'}$$

în care n' = coeficientul Hill. Acesta exprimă forţa de interacţiune între situsurile cooperative ale enzimei: cu cît valoarea sa este mai mare, cu atît curba sigmoidală se aplatizează [curba (—) în fig. IV.24] îndepărtîndu-se de curba hiperbolică a enzimelor michaeliene.

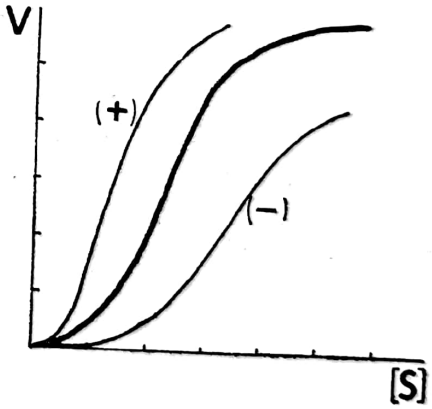
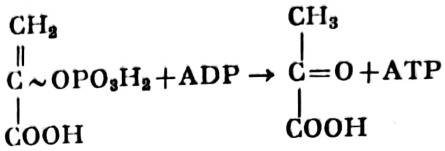


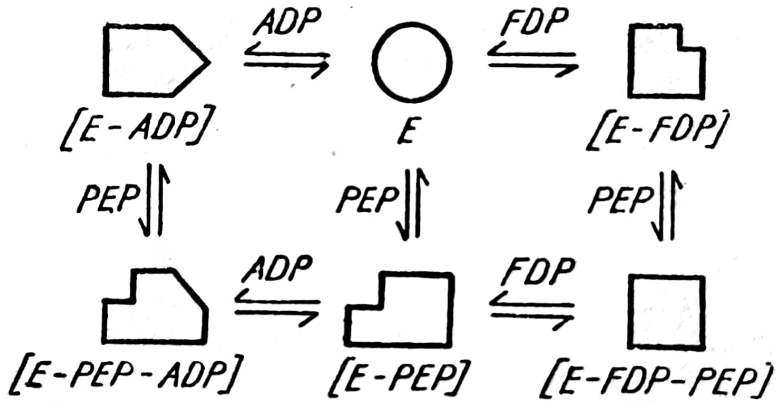
Fig. IV.24. Acţiunea efectorilor asupra vitezei unei reacţii catalizată de o enzimă alosterică: activatori alosterici (+), inhibitori alosterici (—).

Din cele menţionate aici, rezultă că atît în forma R cît şi în forma T există relaţii strînse de conformaţie între protomerii oligomerului. Într-adevăr, schimbarea stării unui protomer antrenează — în mod necesar — transformarea celorlalţi, ceea ce conduce la concluzia că structura cuaternară a enzimelor alosterice nu trebuie concepută ca o simplă juxtapunere de subunităţi, ci ca o formă nouă spaţială în care fiecare unitate este asociată cu celelalte, într-o strînsă interdependenţă.

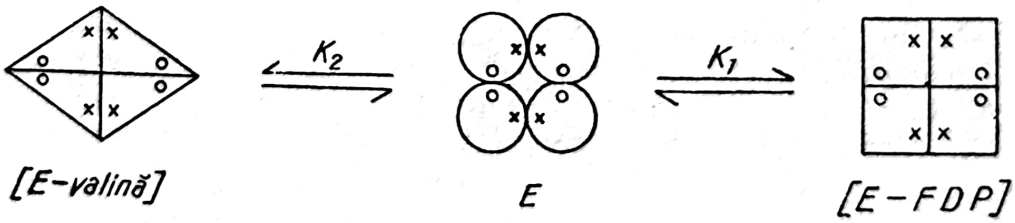
Un exemplu tipic de enzimă alosterică este piruvatkinaza. Aceasta este o enzimă-cheie, reglatoare, aflată în toate celulele în care are loc glicoliza. Într-adevăr, așa cum se specifică în capitolul IX, piruvatkinaza este enzima din secvența glicolitică responsabilă de transferul radicalului fosforic de la fosfoenolpiruvat la nucleotidul ADP:



Studii recente referitoare la mecanismul reacției catalizată de piruvatkinază au dovedit că enzima (E) fixează, în mod independent fosfoenolpiruvat (PEP), ADP și fructozodifosfat (FDP). Fiecare din acești trei liganzi induce modificări conformaționale pentru enzimă (vezi schema). Fixarea suplimentară de liganzi la complecșii: [E—ADP] și [E—FDP] are ca rezultat generarea de noi conformații: [E—PEP—ADP] și [E—FDP—PEP]. Este de remarcat că numeroase date experimentale au evidențiat proprietăți net distincte pentru stadiile piruvatkinazei (liberă și cu liganzi), ceea ce îndreptățește atribuirea cîte unei conformații speciale fiecărui stadiu. Piruvatkinaza din organismul mamiferelor este un tetramer cu greutate moleculară de aproximativ 60 000 daltoni, constituit din unități foarte asemănătoare.



Fixarea pe tetramer a doi efectori alosterici diferiți (FDP ca activator și valina ca inhibitor) are ca rezultat modificarea distanței dintre punctele de contact ale protomerilor:



Bineînțeles, așa cum s-a mai menționat, activatorul alosteric suprimă efectul cooperativ iar inhibitorul alosteric accentuează acest efect.

8. REPARTIZAREA CELULARĂ A ENZIMELOR

Prin centrifugare — în anumite condiții — constituienții celulari se separă în fracțiuni cuprinzînd: nucleii, mitocondriile, microsomii și un lichid super-

natant. Analiza conținutului fiecărei fracțiuni astfel separate a arătat că ele conțin enzime dar acestea nu sînt distribuite în mod uniform. Astfel, în mod selectiv, în nucleu se află NAD-pirofosforilaza, în mitocondrii succinat-dehidrogenaza și citocromoxidaza, în microzomi fosfataza alcalină și glucozo-6-fosfataza iar în lichidul supernatant glucozofosfat-dehidrogenaza și aldolaza. Pe lîngă distribuirea selectivă a enzimelor intracelulare, cercetările au arătat că fracționarea ulterioară a mitocondriilor și microsomilor conduce la obținerea unor particule mult mai mici dar care sînt adevărate edificii enzimatice capabile să efectueze șiruri întregi de reacții metabolice. Spre exemplu, cele obținute prin fracționarea mitocondriilor cuprind toate enzimele care caracterizează reacțiile din lanțul respirator. Dealtfel, mitocondriile reprezintă edificiul responsabil atît de catabolismul substanțelor nutritive cît și de formarea concomitentă a rezervelor celulare de energie (ATP-ul și creatinfosfatul). În schimb, unii microsomi sînt adaptați biosintezei proteinelor și lipidelor celulare. Alți microzomi, numiți lizozomi, conțin — în stare inactivă — numeroase enzime implicate în hidroliza constituienților celulari (proteaze, nucleaze, esteraze, fosfataze, lipaze) și care devin active în cursul proceselor de necroză.

Adesea, mai multe enzime participante la aceleași șiruri de reacții metabolice constituie împreună veritabile „sisteme multienzimatice". Spre exemplu, sistemul piruvatcarboxilazei este constituit din trei proteine. Una din acestea fixează coenzima, biotina, printr-o legătură amidică la una din grupările $-NH_2$ din lizină; a doua — numită biotincarboxilaza — catalizează fixarea de CO_2 pe biotină, utilizînd energia eliberată dintr-o legătură macroergică a ATP-ului, a treia — care este o carboxiltransferază — catalizează transferul grupării carboxilice de la biotina carboxilată la piruvat, conducînd la formarea oxalacetatului.

Este de remarcat faptul că în celule enzimele nu acționează ca atunci cînd se creează condițiile lor optime în afara mediului celular. Astfel, viteza reacțiilor de oxidare este mult mai mare cînd enzimele participante se află în mediu extracelular, decît atunci cînd sînt integrate în structuri celulare. Aceasta dovedește că organismele dispun de mijloace adecvate de frînare sau accelerare a unui șir de reacții enzimatice sau a altuia, în funcție de necesități. Aceste mijloace utilizate de organisme sînt — în esență — cele participante la reglarea metabolismelor (vezi capitolele IX—XIII). De asemenea, în funcție de localizarea lor celulară, proteinele enzimatice pot suferi adesea unele stînjeniri sau constrîngeri de natură fizică, avînd ca rezultat modificarea proprietăților și în special, a activității enzimatice. Fenomenul de modificare a proprietăților unei enzime în funcție de faptul că ea este liberă sau atașată de o membrană, se numește *alotopie*. Studiindu-se alotopia în cazul mai multor enzime s-a ajuns la concluzia că o enzimă este mai activă cînd se află atașată de o structură membranară. Dealtfel, acesta este și cazul adenilatciclazei a cărei activitate este reglată de modificările produse asupra membranei celulare.

9. RELAȚIA DINTRE ENZIME ȘI PATOLOGIE

Funcționarea normală a organismului viu este rezultatul acțiunii armonioase a tuturor sistemelor enzimatice. Se înțelege — în aceste condiții — că orice modificare a unei enzime sau absența ei totală atrage tulburarea întregu-

Scanned with OKEN Scanner

lui şir de reacţii metabolice la care participă enzima respectivă. De fapt, experienţa a dovedit că ori de cîte ori se introduc anumiţi inhibitori specifici (antivitamine, antisubstrate) enzimele corespunzătoare sînt blocate şi în organism apar diverse consecinţe patologice care pot conduce la deznodămîntul fatal.

Un număr foarte mare de cercetări a demonstrat că orice simptom patologic poate fi asociat unui proces metabolic perturbat, ceea ce înseamnă că — în fond — simptomul îşi are drept cauză comportarea anormală a uneia sau mai multor enzime. Prin urmare, oricare ar fi etiologia unei maladii (infecţioasă, traumatică, congenitală), tulburările patologice sînt rezultatul alterării sistemelor enzimatice, astfel încît se poate afirma — fără exagerare — că orice boală este o boală metabolică, datorată unui defect enzimatic (sau leziune enzimatică).

În capitolele privitoare la metabolismul intermediar al glucidelor, lipidelor şi proteinelor sînt prezentate diverse boli metabolice, menţionîndu-se, în fiecare caz, şi defectul enzimatic corespunzător. Pe de altă parte, trebuie subliniat aici şi aportul în clinică a analizei enzimatice efectuate pe umori, secreţii şi chiar ţesuturi din organism. Într-adevăr, în urma multor analize enzimatice de acest gen s-au pus în evidenţă anomalii patologice caracteristice unui număr foarte variat de boli (vezi capitolele privind biochimia sîngelui şi a organelor: muşchi, ficat, rinichi).

10. IZOENZIMELE

10.1. DEFINIŢII

Studiul enzimelor plasmatice la organisme aflate în diverse stări patologice a permis să se surprindă faptul că anumite enzime prezintă fiecare mai multe varietăţi moleculare. Acest fapt a condus la crearea termenilor: „forme multiple enzimatice" şi „izoenzime" sau „izozime". Conform recomandărilor făcute în 1976 de către Comisia de nomenclatură biochimică (CBN) a Uniunii internaţionale de biochimie (IUB), termenii menţionaţi au semnificaţiile următoare:

— „Forme multiple enzimatice" se referă la toate proteinele cu acţiune enzimatică ce catalizează aceeaşi reacţie şi care se află răspîndite, în mod natural, într-o singură specie.

— „Izoenzime" sau „izozime" sînt acele forme multiple enzimatice care iau naştere prin diferenţieri determinate genetic la nivelul structurii lor primare şi nu formele derivate prin modificarea aceleiaşi secvenţe primare.

Izoenzimele aceleiaşi enzime pot să difere şi prin sarcina electrică (ceea ce a permis separarea lor electroforetică), prin pH-ul optim de acţiune, prin termostabilitate, prin comportarea faţă de inhibitori, prin activitatea faţă de analogii coenzimelor respective, prin valorile lor K_M (ceea ce explică faptul că se comportă diferit în prezenţa diverselor concentraţii de substrate) şi prin acţiunea lor asupra substratelor secundare.

10.2. EXEMPLE DE IZOENZIME

Dintre izoenzimele diverselor enzime s-au studiat în special, formele moleculare multiple ale lactatdehidrogenazei (LDH). În mod obişnuit, în ţesutu-

Scanned with OKEN Scanner

rile mamiferelor se întîlnesc cinci forme moleculare de LDH. Ele sînt, de fapt, tetrameri rezultaţi prin reunirea (la întîmplare) a cîte două tipuri de monomeri deosebiţi din punct de vedere imunologic dar cu greutăţi moleculare apropiate. Monomerii lactatdehidrogenazei sînt: de origine musculară (M) şi de origine cardiacă (H). Tipul muscular pur este tetramerul M_4 iar tipul cardiac pur este tetramerul H_4. Celelalte trei izoenzime sînt hibrizii: M_3H_1, M_2H_2 şi M_1H_3. Sinteza monomerilor M şi H este controlată de două gene deosebite a căror reglare este, în mod cert, independentă.

Izoenzima de tip muscular pur (M_4) este inactivată la temperatura de 55°, în timp ce izoenzima de tip cardiac pur (H_4) rezistă chiar la 60°. Concentraţia optimă de substrat pentru tetramerul M_4 este de 1,2 mM iar pentru tetramerul H_4 este de 0,15 mM. Valoarea K_M pentru H_4 este $7{,}7 \times 10^{-5}$ M, iar pentru M_4 este $8{,}3 \times 10^{-3}$M. Izoenzima H_4 catalizează atît reacţia de reducere a piruvatului în lactat cît şi reacţia de reducere a α-cetobutiratului în α-hidroxibutirat. În schimb, izoenzima M_4 nu catalizează decît reducerea piruvatului în lactat, fapt care pledează pentru deosebirile de comportament între diversele izoenzime ale aceleiaşi enzime.

Alte exemple de enzime care prezintă forme moleculare multiple sînt: malatdehidrogenaza, gliceraldehid-3-fosfat-dehidrogenaza, piruvatkinaza (cu structură de tetramer), creatin-kinaza (cu structură de dimer). De asemenea, mai prezintă izoenzime cunoscute şi studiate: hexokinaza, fosfataza alcalină şi aldolaza.

Semnificaţia prezenţei în mediile biologice, umori şi ţesuturi a unor anumite izozime şi utilizarea lor în clinică pentru precizări de diagnostic sînt expuse în capitolele privind biochimia sîngelui şi a unor ţesuturi.

10.3. CRITERIILE DE DIFERENŢIERE ŞI DE NOMENCLATURĂ ALE IZOENZIMELOR

În 1976, Comisia de nomenclatură biochimică (CBN) a stabilit următoarele criterii de diferenţiere şi nomenclatură a izoenzimelor.

În mod obişnuit, numele unei izoenzime trebuie să fie constituit din numele enzimei corespunzătoare urmat de un număr. De preferinţă, acest număr este în legătură cu mobilitatea electroforetică, atribuindu-se numărul cel mai mic formei cu cea mai mare mobilitate spre anod. Deoarece în cazul izoenzimelor complexe apar zone electroforetice, numărul care succedă numele enzimei indică zona şi este urmat — la rîndul lui — de litere care indică subzone. Spre exemplu, 1_a, 1_b, 1_c, 2_a, 2_b etc. În sfîrşit, pentru evidenţierea neechivocă a unei izoenzime se mai specifică şi alte caracteristici: greutate moleculară, stabilitate etc.

Studiile referitoare la diferenţierea izoenzimelor au arătat că numeroase enzime sînt interconvertibile. Se numeşte „enzimă interconvertibilă" acea enzimă care există în cel puţin două forme bine definite şi care pot trece reversibil una în alta, prin modificări ale aminoacizilor din catenele laterale, în condiţii biologice. Pentru desemnarea fiecărei forme, în cazul enzimelor interconvertibile, se recomandă următoarele:

1. Numele izoenzimei se precedă de litera *o* (original) cînd ea cuprinde radicali nemodificaţi de aminoacizi şi de *m* (modificat) în cazul catenelor

Scanned with OKEN Scanner

modificate de aminoacizi. Pentru enzimele interconvertibile cu punți disulfurice, forma —SH este desemnată cu *o* și cea —S—S— cu *m*.

2. Enzimele interconvertibile oligomere sînt cele care cuprind două sau mai multe subunități modificabile (forme hibride). Pentru diferențierea fiecărei forme se folosesc literele potrivite *o* sau *m*, urmate de un număr care arată subunitățile din fiecare formă. Spre exemplu, o_n, $o_{n-1}m$, $o_{n-2}m_2$. . . o_2m_{n-2}, o m_{n-1}, m_n.

3. Dacă enzima modificată are capacitatea de a fixa — prin legături covalente — anumite grupări, natura și numărul acestor grupări se specifică în paranteză, după numele enzimei.

4. Trecerile formelor inactive în active sînt indicate de literele *a* (pentru activă) și *b* (pentru inactivă sau mai puțin activă). Literele *a* și *b* se plasează după numele enzimei.

Exemple de aplicare a regulilor de mai sus:

a) Pentru *glutaminsintetază*, forma originală (nemodificată) cu 12 subunități și activă, se folosește notația o_{12}-glutaminsintetaza a; forma modificată cu 12 subunități, inactivă se specifică prin notația m_{12}-glutaminsintetaza b; forma hibridă constituită — în părți egale — de subunități originale și modificate, se notează prin o_6m_6-glutaminsintetaza.

b) Pentru *fosforilază*, forma originală, inactivă, se desemnează prin o-fosforilaza b, dimerul prin o_2-fosforilaza iar forma modificată cu 4 resturi fosforice atașate prin m-fosforilaza (4P).

11. ENZIME IMOBILIZATE

În ultima decadă au luat o mare amploare studiul și aplicațiile practice ale enzimelor imobilizate sau insolubilitate (Katchalski, Porath, Lilly, Broun). Această condiție creată în mod artificial se apropie de cea naturală a sistemelor enzimatice incluse ca unități structurale și funcționale în membranele biologice. O trăsătură caracteristică, importantă pentru aplicațiile practice și care decurge din imobilizare, este aceea că cinetica acestor sisteme se îndepărtează de legile obișnuite ale cineticii în sistem omogen; ea se apropie de aceea a enzimelor alosterice, care prezintă interacții cooperative. Factorul important care determină cinetica reacției în interiorul structurii enzimă-suport este difuzia speciilor moleculare. Faza structurată nu permite agitarea, adică deplasarea moleculelor prin convecție, ci numai prin difuzie. Imobilizarea mărește durata de viață a enzimelor micșorînd probabilitatea distrugerii lor ireversibile sau a termodenaturării și scăzînd capacitatea de autoliză (tripsina). Reactivitatea imunologică a proteinelor enzimatice se pierde prin insolubilizare. Pot fi imobilizate toate clasele de enzime cu excepția ligazelor.

Pentru prepararea sistemelor de enzime imobilizate se cunosc 4 metode principale: (1) absorbția pe suport inert (sticlă, nylon, colodiu) sau pe rășini schimbătoare de ioni (sefaroză activată cu bromură de cianogen, carboxi-metilceluloză, DEAE-celuloză). Se mai folosesc ca suporturi derivați de polistiren, peptide artificiale, polimeri micști de polilizină și anhidridă maleică, derivați de metacrilat, siliconi; (2) legarea încrucișată covalentă a proteinei enzimatice de un suport insolubil în apă prin grupări funcționale

Scanned with OKEN Scanner

neesențiale pentru activitatea sa biologică; (3) incluzia în geluri reticulate de poliacrilamidă (sau sefadex); (4) legarea încrucișată covalentă a proteinei enzimatice prin intermediul unui reactiv bifuncțional (spre exemplu, aldehidă glutarică).

Enzimele imobilizate au atît importanță teoretică pentru modelarea membranelor biologice naturale cît și practică, datorită duratei lor de viață prelungite. Au aplicații în tehnologia industrială (ca agenți biologici), în metodica de laborator — cromatografia de afinitate și dozări (glucoză, uree, acid uric) cu enzime fixate pe suporturi — și în terapie. Dintre aplicațiile terapeutice de perspectivă pot fi menționate două mai importante: a) *protezele interne enzimatice*, prin implantare permanentă a unei enzime imobilizate pentru tratamentul erorilor enzimatice înnăscute; b) *membranele de oxigenare* (purtătoare de catalază și anhidrază carbonică) în dializa renală. Încercări terapeutice cu rezultate bune s-au făcut cu urokinază imobilizată în trombozele venoase. Un sistem important pentru terapie este și cel reprezentat de *liposomi*, în care se includ enzime lizozomale pentru tratamentul substitutiv în tezaurismozele sfingolipidozice, în special. Enzimele se includ în membrane lipidice artificiale sau în membrane de eritrocit.

12. CLASIFICAREA ENZIMELOR

12.1. INTRODUCERE

Enzimele cunoscute sînt numeroase și pe zi ce trece se mai descoperă altele. Pentru ca studiul monografic al celor cunoscute să se poată face în mod sistematic, a fost necesară clasificarea lor. În principiu, clasificarea enzimelor s-a făcut luîndu-se în considerare pe de o parte, genul reacțiilor pe care enzimele le catalizează iar pe de altă parte, substratele corespunzătoare.

Din cauza marii varietăți a reacțiilor enzimatice, multă vreme (pînă în timpul din urmă) a fost greu să se folosească, în mod consecvent, un singur sistem de clasificare. De aceea, în paralel sau pe rînd, s-au propus și s-au folosit mai multe clasificări diferite. Trebuie remarcat însă că uneori două din aceste clasificări par deosebite, deși în realitate ele sînt esențialmente la fel; faptul se datorește deosebirilor de nomenclatură căci foarte multe enzime și categorii de enzime au fost numite, fiecare, în mai multe feluri.

În principiu, o enzimă s-a numit cu numele substratului ei, urmat de terminația *-ază*; spre exemplu: urează, arginază etc., enzima care activează: ureea, arginina etc. în anumite reacții.

S-a constatat însă că adesea este necesar ca denumirile să aibă o structură mai complexă așa încît să precizeze atît substratul enzimei cît și felul reacției pe care enzima o catalizează. Spre exemplu: oxalacetat-decarboxilaza, glutamat-sintetaza etc.

Cum însă, o aceeași transformare chimică a unei aceleiași substanțe poate fi catalizată de mai multe enzime diferite — atît prin proveniența lor cît și prin diverse proprietăți intrinseci (specificitate, constantă Michaelis, pH optim etc.) — s-a propus ca enzimele să se mai deosebească și adăugîndu-se numelui fiecăreia o specificare caracteristică. Spre exemplu: maltaza *din malț*, maltaza *din intestin* sau fosfataza *acidă*, fosfataza *alcalină* etc.

Scanned with OKEN Scanner

12.2. CLASIFICAREA FUNDAMENTALĂ A ENZIMELOR ŞI CRITERIILE DE NOMENCLATURĂ

O asemenea clasificare, rod al studiilor a numeroşi cercetători, a fost propusă şi adoptată în 1961 de către Uniunea internaţională de biochimie (IUB — International Union of Biochemistry). La prima vedere, ea apare complexă; cu toate acestea, este foarte sistematică, precisă, descriptivă (în special, pentru procesul catalizat de enzima respectivă) şi foarte utilă din punct de vedere al informării biochimice.

Nomenclatura enzimelor în această clasificare modernă se face atribuindu-se fiecăreia nume constituite din două părţi: prima parte este numele substratului sau substratelor iar a doua parte terminată în *ază*, indică tipul reacţiei catalizată. Spre exemplu: L-lactat: NAD-oxidoreductază, ATP-piruvat: fosfotransferaza. Bineînţeles, această clasificare va fi urmărită şi aici, fiind cea mai cuprinzătoare şi mai uniformă. Denumirea sistematică nu poate fi aplicată enzimelor (de felul tripsinei, chimotripsinei) pentru care nu este posibil să se precizeze reacţia catalizată. Datorită acestui fapt, se mai păstrează şi numele „triviale" ale unor enzime. Dealtfel, numele triviale pot dubla adesea numele sistematice; spre exemplu: L-lactat-NAD-oxidoreductaza se mai numeşte şi lactat dehidrogenaza.

Fiecare enzimă are un număr de ordine (cod). Acesta este format din combinarea a patru numere: primul indică clasa (există 6 clase mari de enzime), al doilea precizează reacţia catalizată de enzimă indicînd principala funcţie chimică implicată în reacţie, al 3-lea şi al 4-lea număr precizează natura partenerilor reacţiei. Spre exemplu, pentru ATP: arginino-fosfotransferază numărul codului este 2.7.3.3 care indică faptul că enzima este o transferază (nr. 2) catalizînd transferul unui grup fosfat (nr. 7) pe un substrat azotat (primul nr. 3) care este arginina (al doilea nr. 3).

Cele şase clase mari de enzime sînt: (1) Oxidoreductazele; (2) Transferazele; (3) Hidrolazele; (4) Liazele; (5) Izomerazele; (6) Ligazele. Fiecare clasă cuprinde mai multe subclase. Dintre subclase se vor menţiona aici numai cele mai importante, precizîndu-se numărul lor de ordine în clasificare iar enzimele date ca exemplu — în fiecare subclasă — vor fi cele care iau parte la procese metabolice fundamentale din organism. Pentru fiecare enzimă menţionată se vor preciza: numele (potrivit criteriilor stabilite) şi reacţia metabolică la care participă.

12.2.1. OXIDOREDUCTAZELE

Se numesc oxidoreductaze enzimele (notate cu 1 în clasificare) care catalizează oxidoreducţii între o pereche de substrate *A* şi *B*:

$$A_{red} + B_{ox} \rightleftharpoons A_{ox} + B_{red}$$

Această clasă importantă de enzime cuprinde şi pe cele care altădată erau cunoscute sub numele de *dehidrogenaze* sau *oxidaze*, precum şi hidroxilazele, peroxidazele şi catalazele.

Subcategoriile sînt enzime care catalizează oxidoreducţii de grupări:

$$\rangle CHOH, \qquad \rangle C{=}O, \qquad \rangle CH-CH\langle, \qquad \rangle CH-NH_2$$

1.1. *Oxidoreductaze acţionînd asupra grupărilor* >CHOH *ale donorilor.*

1.1.1. Cu NAD^+ sau $NADP^+$ ca acceptori:

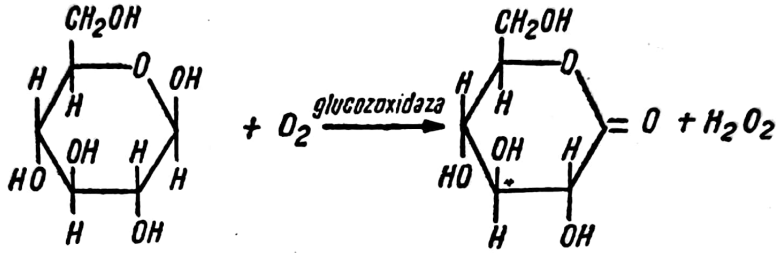
a) *alcooldehidrogenaza*

$$CH_3-CH_2OH+NAD^+ \rightarrow CH_3-\overset{\overset{H}{|}}{\underset{\underset{O}{\|}}{C}} +NADH+H^+$$

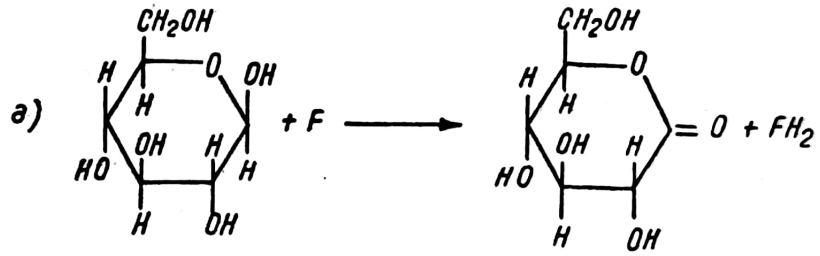
b) *lactatdehidrogenaza*

$$CH_3-CHOH-COOH+NAD^+ \rightarrow CH_3-CO-COOH+NADH+H^+$$

1.1.3. Cu O_2 ca acceptor:



Glucozoxidaza este o *flavoproteină.* Reacţia are loc în două etape:



b) $FH_2 + O_2 \longrightarrow F + H_2O_2$

F=flavină, cu grupul prostetic funcţionînd ca transportor de H.

1.2. Oxidoreductaze acţionînd asupra unor grupe *aldehidice* sau *cetonice* ale donorilor:

1.2.1. Cu NAD^+ sau $NADP^+$ ca acceptori:

Aldehido-dehidrogenaza

$$CH_3-\underset{\underset{O}{\|}}{CH}+NAD^+ +H_2O \rightarrow CH_3-COOH+NADH+H^+$$

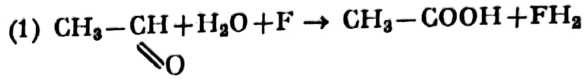
1.2.3. Cu O_2 ca acceptor:

Aldehidoxidaza

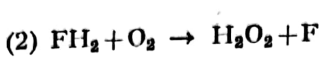
$$CH_3-\underset{\underset{O}{\|}}{CH}+O_2+H_2O \rightarrow CH_3-COOH+H_2O_2$$

Scanned with OKEN Scanner

Aldehidoxidaza fiind o flavoproteină şi acest proces decurge în două etape:



(1) $CH_3-CH(=O)+H_2O+F \rightarrow CH_3-COOH+FH_2$

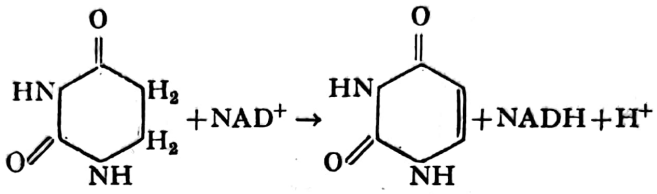


(2) $FH_2+O_2 \rightarrow H_2O_2+F$

1.3. Oxidoreductaza acţionînd asupra unor grupări $>CH-CH<$ ale donorilor.

1.3.1. Cu NAD sau NADP ca acceptori:

dihidro-uracil-dehidrogenaza:

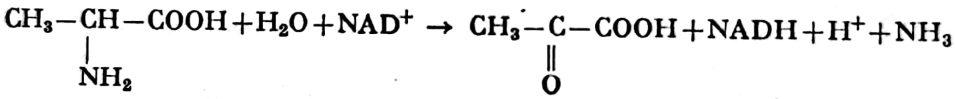


$+NAD^+ \rightarrow$ $+NADH+H^+$

1.4. Oxidoreductaze acţionînd asupra grupărilor $>CH-NH_2$ ale donorilor.

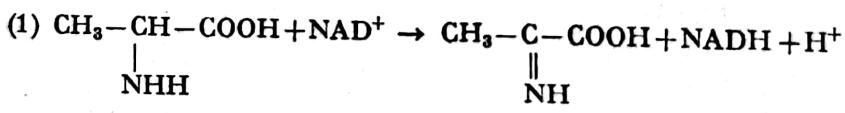
1.4.1. Cu NAD^+ sau $NADP^+$ ca acceptori:

a) *Alanindehidrogenaza:*

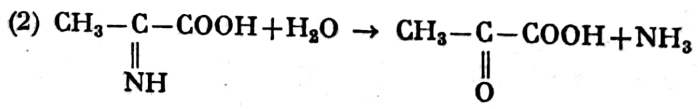


$CH_3-CH(NH_2)-COOH+H_2O+NAD^+ \rightarrow CH_3-C(=O)-COOH+NADH+H^++NH_3$

Reacţia are loc în două etape:

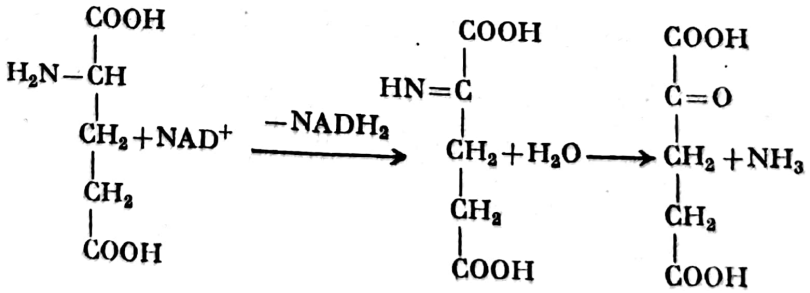


(1) $CH_3-CH(NHH)-COOH+NAD^+ \rightarrow CH_3-C(=NH)-COOH+NADH+H^+$



(2) $CH_3-C(=NH)-COOH+H_2O \rightarrow CH_3-C(=O)-COOH+NH_3$

b) *Glutamatdehidrogenaza:*



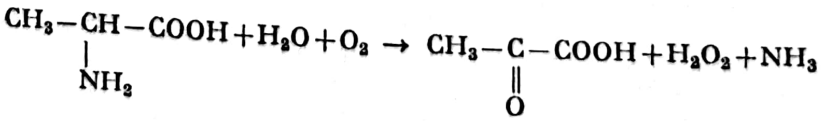
$-NADH_2$

$+H_2O$

$+NH_3$

1.4.2. Cu O_2 ca *acceptor:*

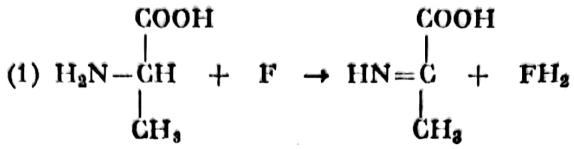
a) *L-aminoacidoxidaza*

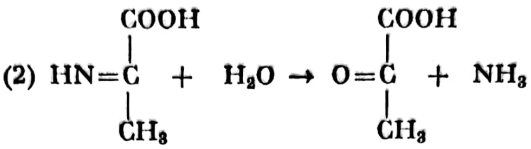


$CH_3-CH(NH_2)-COOH+H_2O+O_2 \rightarrow CH_3-C(=O)-COOH+H_2O_2+NH_3$

Scanned with OKEN Scanner

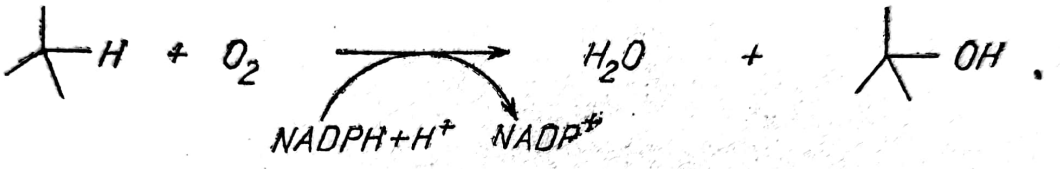
Enzima este o *flavoproteină*. Reacţia decurge în 3 etape:





(3) $FH_2 + O_2 \rightarrow F + H_2O_2$

Hidroxilazele catalizează oxidarea nucleelor aromatice sau ciclice. Aceste enzime necesită adesea NADPH ca donor de hidrogen:



Printre hidroxilaze se numără cele care cuprind citocromul P_{450} — cu roluri importante — în special, în ficat.

Peroxidazele catalizează oxidarea substratului cu ajutorul oxigenului din peroxizi (apa oxigenată):

Acţiunea peroxidazelor este pusă în evidenţă urmărindu-se oxidarea unui reactiv de oxidoreducere (fenolftaleina redusă, incoloră, devine roşie prin oxidare) în prezenţa apei oxigenate. Deoarece leucocitele conţin peroxidaze reacţia menţionată este adesea utilizată pentru evidenţierea acestor elemente figurate în urină.

Catalazele catalizează descompunerea apei oxigenate libere:

$$H_2O_2 + H_2O_2 \rightarrow 2\,H_2O + O_2$$

12.2.2. TRANSFERAZELE

Al doilea grup mare de enzime notate cu 2 în clasificarea menţionată, este cel al *transferazelor*.

Transferazele sînt enzime care catalizează transferul unui grup X — altul decît hidrogen — între o pereche de substrate A şi B:

$$AX + B \rightarrow BX + A$$

În această clasă sînt cuprinse enzime care catalizează transfer de:

1 — grupe cu 1 atom de carbon,
2 — grupe aldehidice sau cetonice (sau resturi de acest fel),
3 — grupe acil,

Scanned with OKEN Scanner

4 — grupe glicozil,
5 — grupe cuprinzînd azot (în special, grupe amino),
6 — grupe cuprinzînd fosfor (în special, resturi de acid fosforic),
7 — grupe cuprinzînd sulf.

2.1. *Transferaze care înlesnesc transferuri de grupe cu 1 atom de carbon:*

a) *Metiltransferaza* (transmetilaza)

betaino-homocisteino-metiltransferaza:

$$(CH_3)_3N^+-CH_2-COOH + HS-CH_2-CH_2-\underset{\displaystyle NH_2}{\underset{|}{CH}}-COOH \rightarrow$$

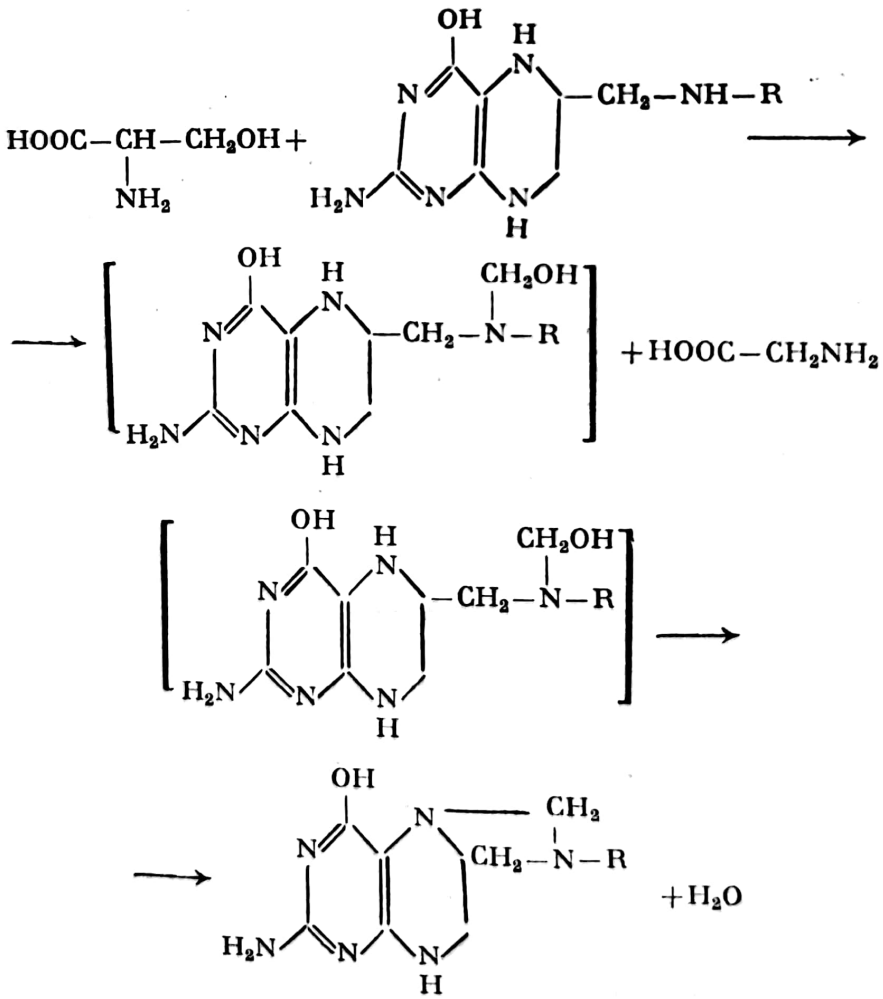
betaina glicocolului — L-homocisteina

$$\rightarrow (CH_3)_2=N-CH_2-COOH + CH_3-S-(CH_2)_2-\underset{\displaystyle NH_2}{\underset{|}{CH}}-COOH + H^+$$

dimetilglicocolul — L-metionina

b) *Hidroximetiltransferaza*

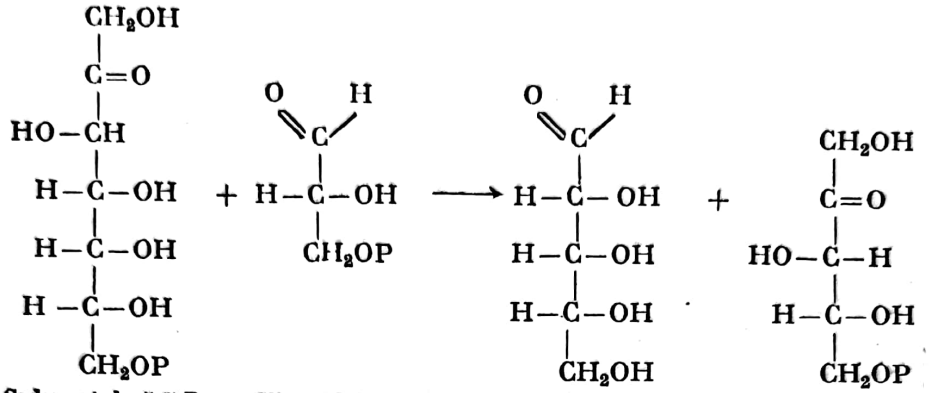
Serinohidroximetiltransferaza catalizează trecerea unui grup hidroximetil de pe serină pe acidul tetrahidrofolic, formîndu-se intermediar acidul 10-hidroximetiltetrahidrofolic iar în final, acidul 5,10-metilentetrahidrofolic; în paralel (corespunzător pierderii de grup hidroximetil) se obţine glicocol din serină:



acid 5,10-metilentetrahidrofolic ($f^{5\,10}$-H_4-folat)

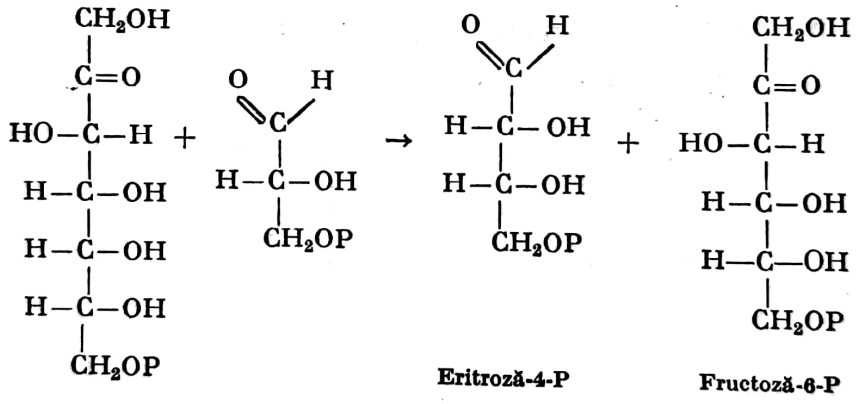
2.2. *Transferaze care înlesnesc transferuri de resturi cetonice sau aldehidice* (transcetolaze, respectiv transaldolaze).

a) *Transcetolaza* (gliceraldehido-transferaza). Această enzimă catalizează transferul unui rest de glicolaldehidă de pe sedoheptuloză-7-P (cetoheptoză) pe gliceraldehidă-3-P, conducînd la formare de riboză-5-P și xiluloză-5-P:



b) *Transaldolaza* (dihidroxiacetono-transferaza):

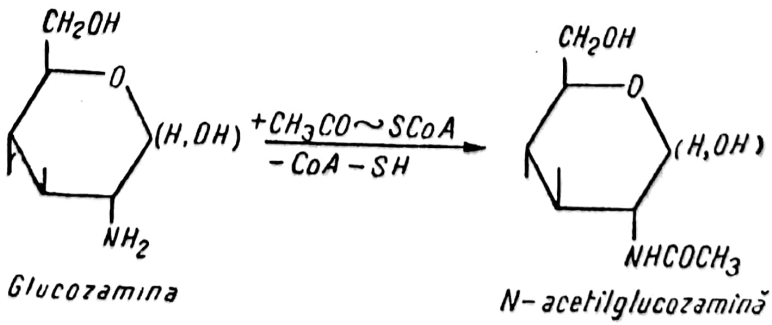
Această enzimă catalizează transferul unui rest de dihidroxi-acetonă tot de pe sedoheptuloză-7-P pe gliceraldehidă-3-P formîndu-se D-eritroză-4-P și D-fructoză-6-P:



Ambele reacții menționate mai sus (sub acțiunea transcetolazei și a transaldolazei) sînt întîlnite într-un proces de degradare a glucidelor numit „calea pentozelor" sau „ciclul hexozomonofosfaților" studiat în capitolul privind glucidele.

2.3. *Transferaze care înlesnesc transferuri de resturi acil* (aciltransferaze sau transacilaze):

a) *Glucozamino-acetiltransferaza* catalizează transferul unui grup acil de pe acetil-SCoA pe glucozamină:

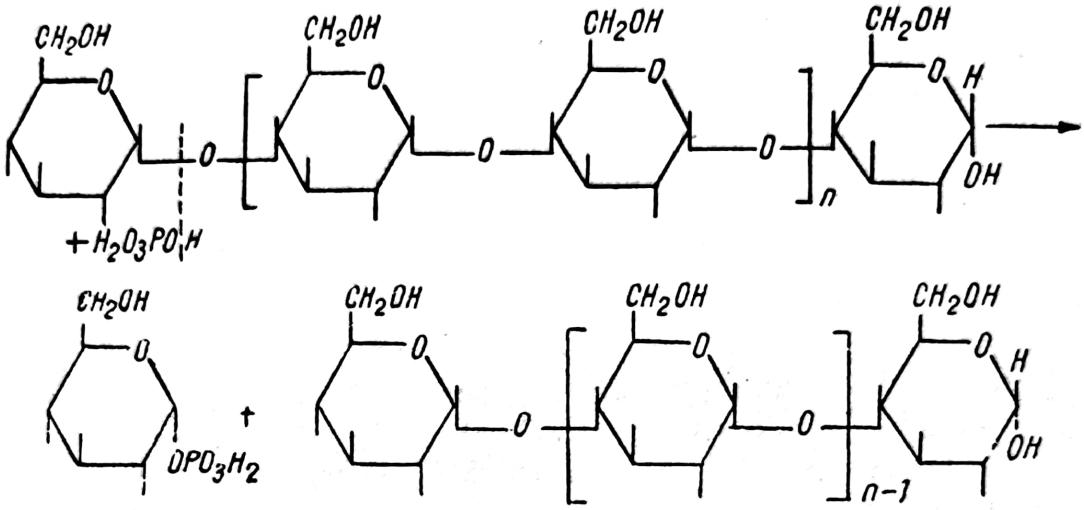


b) *Colino-acetil-transferaza* înlesneşte formarea acetil-colinei prin acetilarea colinei:

$$(CH_3)_3N^+-CH_2-CH_2OH+CH_3-CO\sim SCoA \rightarrow (CH_3)_3N^+-CH_2-CH_2-O-COCH_3+HSCoA$$

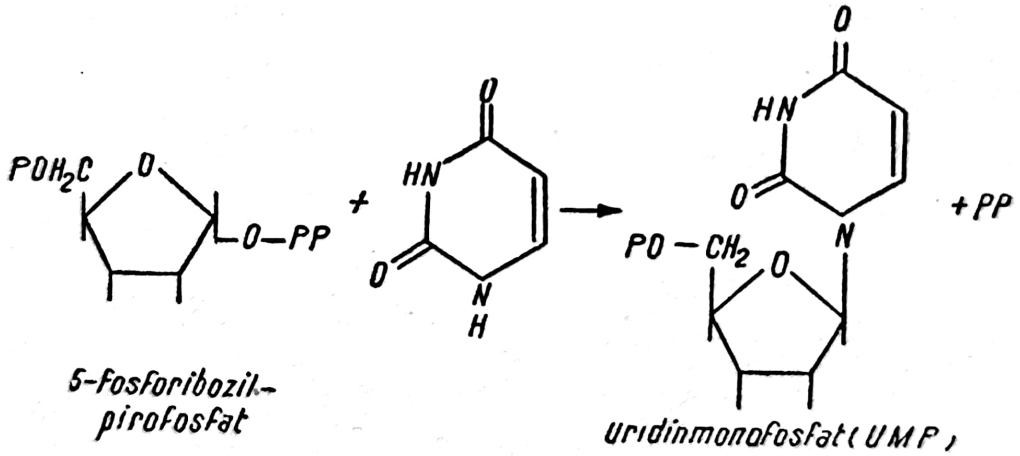
2.4. *Transferaze care înlesnesc transferuri de grupe glicozil* (transglicozilaze sau glicoziltransferaze):

a) α-Glucanfosforilaza (glicoziltransforilaza):



Reacţia prezintă interes la degradarea glicogenului.

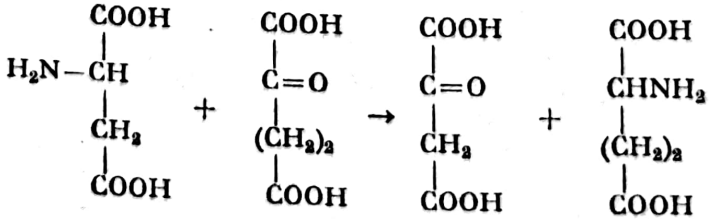
b) *Uracil-fosforiboziltransferaza:*



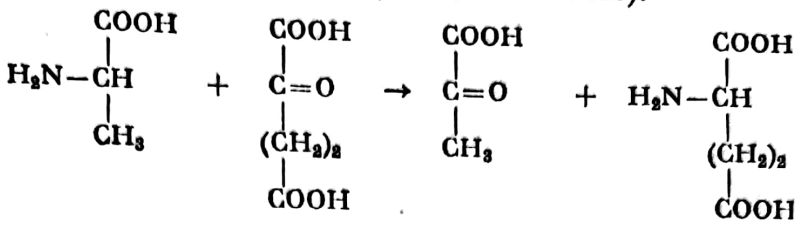
Reacţia este importantă în sinteza nucleotidului cu uracil.

2.5. *Transferaze care catalizează transferuri de grupe cuprinzînd azot* (grupe amine):

a) *L-aspartat aminotransferaza* (GOT, în revers):



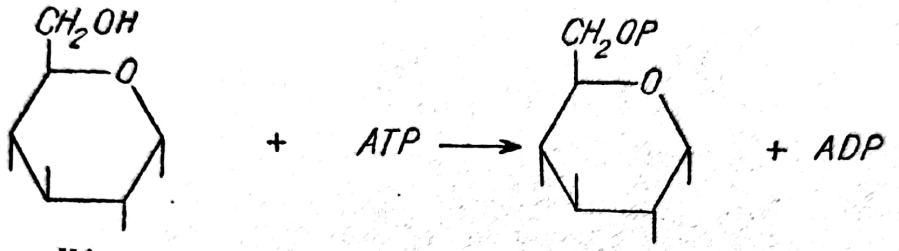
b) *L-alanino-aminotransferaza* (GTP, în revers):



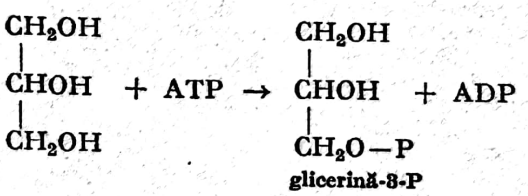
2.6. *Transferaze care catalizează transferuri de grupe fosforilate* (resturi de acid fosforic) pe:

a) *acceptori cu grup alcoolic:*

α) *Hexokinaza*



β) *Glicerolkinaza*

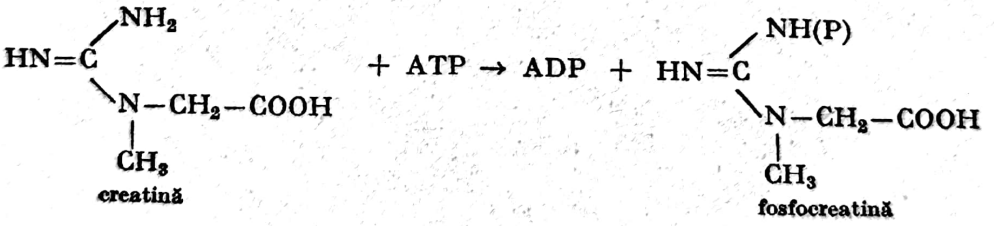


glicerină-3-P

Ambele reacţii (α şi β) prezintă interes în metabolismul glucidelor.

b) *Acceptori cu grup azotat:*

creatin-ATP-fosforiltransferaza sau creatinkinaza

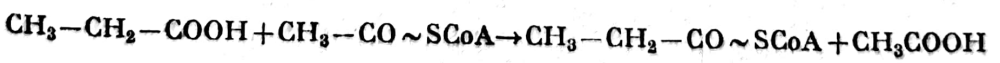


creatină fosfocreatină

Reacţia prezintă interes în procesele de înmagazinare şi mobilizare a energiei la nivelul muşchiului.

2.7. *Transferaze care catalizează transferuri de grupe cuprinzînd sulf:*

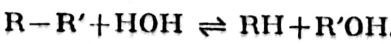
propionat-CoA-Transferaza



12.2.3. HIDROLAZELE

Al treilea grup mare de enzime, notate cu 3 în clasificarea urmărită, este cel al hidrolazelor.

Hidrolazele sînt enzime care catalizează hidrolize conform schemei generale:



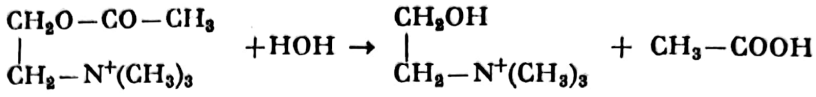
Scanned with OKEN Scanner

Aceste enzime înlesnesc, în special, hidrolize de: (1) esteri, (2) glicozizi, (3) peptide, (4) anhidride de acizi, (5) legături C—N (diferite de cele peptidice).

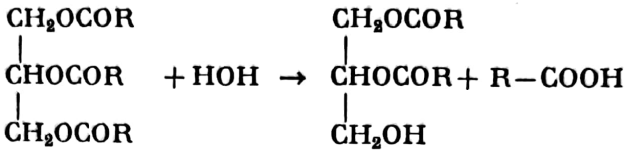
3.1. *Hidrolaze care înlesnesc hidrolize de esteri:*

a) *Carboxilesteraze:*

α) *acilcolin-acil-hidrolaza* sau *colinesteraza*



β) *lipaza*

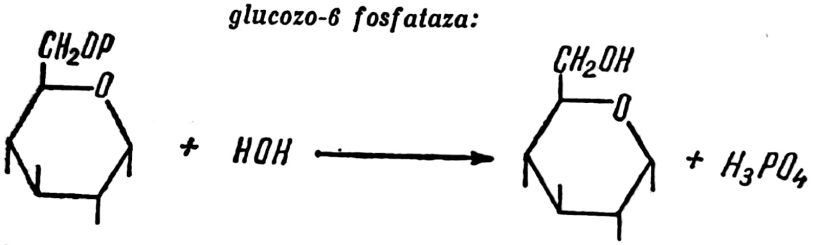


Această reacţie este importantă în degradarea lipidelor.

b) *Fosfoesteraze:*

Fosfomonoesteraze:

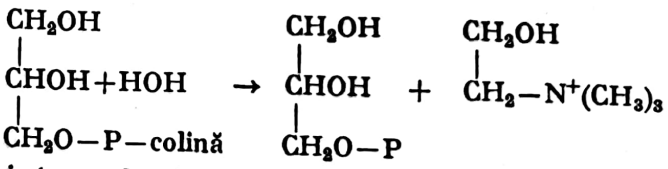
glucozo-6 fosfataza:



Reacţia este importantă în metabolismul glucidelor (liberare de glucoză).

Fosfodiesteraze:

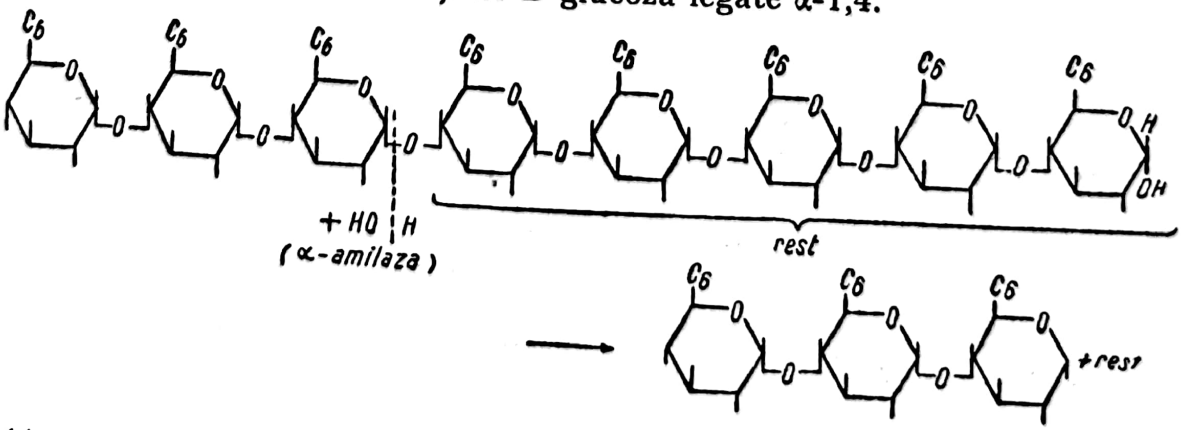
glicerofosforilcolindiesteraza



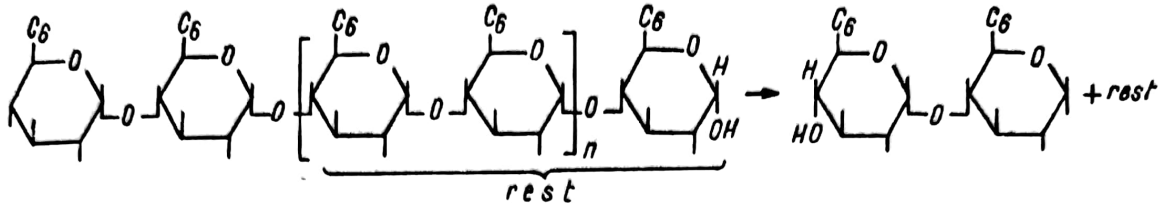
Reacţia prezintă interes la degradarea lipidelor.

3.2. *Hidrolaze acţionînd asupra glicozizilor:*

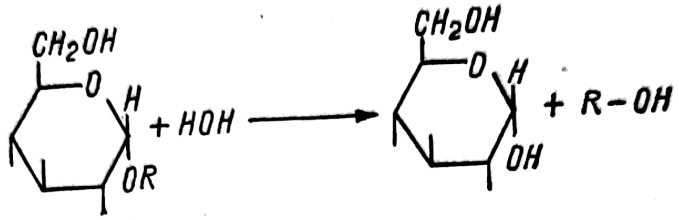
a) *α-amilaza* hidrolizează legături *α-1,4-glicozidice* în polizaharide care conţin mai mult de trei unităţi de D-glucoză legate α-1,4.



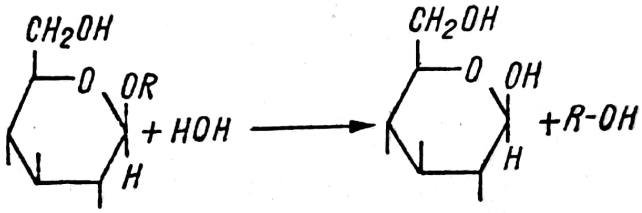
b) β-*amilaza* hidrolizează legături α-1,4-glicozidice în polizaharide aşa încît să se îndepărteze, succesiv, unităţi de maltoză de la capetele nereducătoare ale lanţurilor:



c) α-*glucozidaza:*



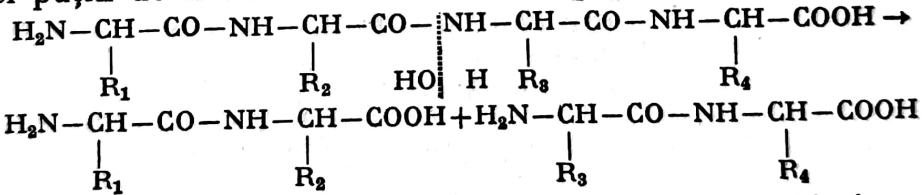
d) β-*glucozidaza:*



3.3. *Hidrolaze acţionînd asupra legăturilor peptidice.*

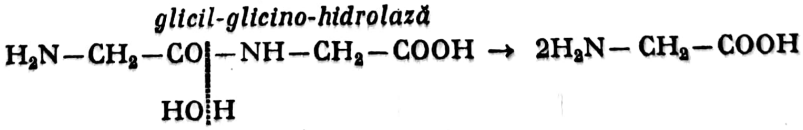
a) *Peptidil-peptido-hidrolaze* (endopeptidaze)

Aceste enzime catalizează hidroliza de legături peptidice între părţi avînd cel puţin două resturi de aminoacizi (peptide):

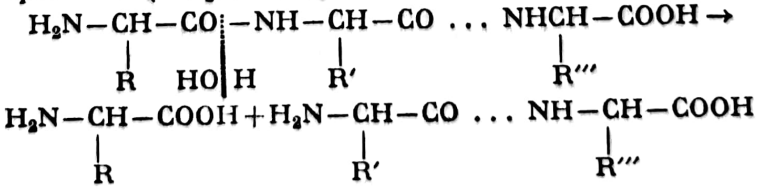


Din această categorie fac parte: pepsina, tripsina, chimotripsina. Specificitatea lor va fi menţionată la studiul metabolismului proteinelor căci sînt enzime participînd la digestia acestora.

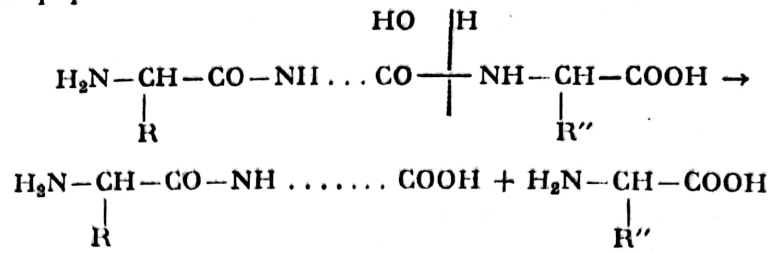
b) *Dipeptidohidrolaze* (dipeptidaze):



c) *Aminopeptidaza* (nespecifică):



d) *Carboxipeptidaza*



3.4. *Hidrolaze acționînd asupra unor legături de anhidridă de acid:*

a) *ATP-fosfohidrolază* (ATP-ază):

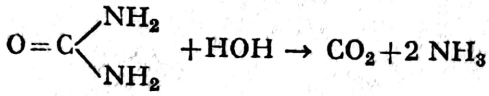
$$ATP + HOH \rightarrow ADP + P_i$$

b) *ATP-pirofosfohidrolază:*

$$ATP + HOH \rightarrow AMP + PP$$

3.5. *Hidrolaze acționînd asupra legăturilor* C—N, *diferite de cele peptidice:*

ureea-amido-hidrolază (urează)



12.2.4. LIAZELE

Liazele, notate cu 4 în clasificare, sînt enzime care catalizează îndepărtarea de grupe din substratele lor prin mecanisme diferite de hidroliză. Reacțiile catalizate de liaze pot fi schematizate astfel:

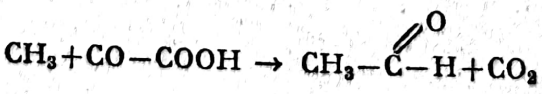
$$CX + CY \rightarrow XY + C{-}C$$

În această categorie intră enzime din subcategoriile:

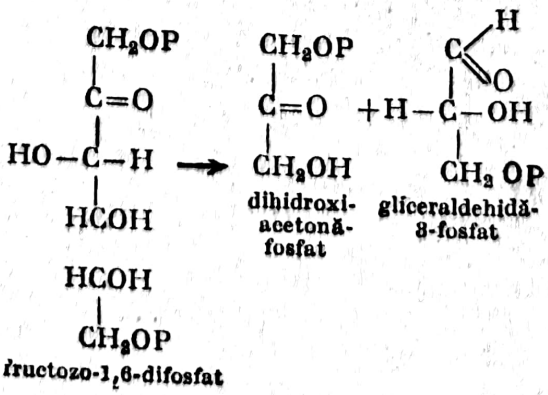
1) Carbon-carbon liaze
2) Carbon-oxigen liaze
3) Carbon-azot liaze

4.1. Ca exemplu de *carbon-carbon liaze* se menționează:

a) *Piruvatdecarboxilaza*



b) *Aldolaza*



Scanned with OKEN Scanner

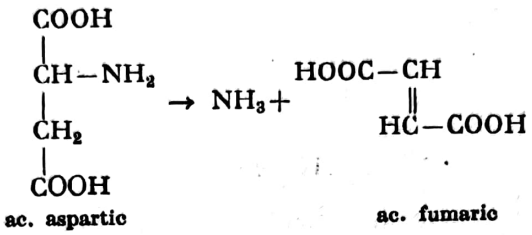
Ambele reacţii prezintă interes metabolic: prima arată decarboxilarea simplă a acidului piruvic; cea de a doua este etapa principală în degradarea glucidelor.

4.2. Exemplu de *carbon-oxigen-liază* este *carbonat-hidro-liaza* (carbonic —anhidraza):

$$H_2CO_3 \rightleftharpoons H_2O + CO_2$$

Reacţia prezintă interes în desfacerea şi refacerea H_2CO_3.

4.3. Exemplu de *carbon-azot liază* este *aspartat-amoniac-liaza:*



ac. aspartic — ac. fumaric

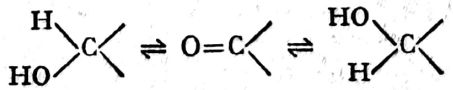
12.2.5. IZOMERAZELE

În clasa izomerazelor, notate cu 5 în clasificare, intră două subclase importante: (1) *racemazele* şi (2) *epimerazele.*

Racemazele transformă compuşi optic-activi în enantiomeri şi intermediar formează compuşi (amestecuri) racemici:

izomer D ⇌ amestec DL ⇌ izomer L

Epimerazele schimbă configuraţia sterică a unui carbon asimetric din compuşi cu unul sau mai multe centre de asimetrie şi transformă compuşii în epimeri:



5.1. Exemplu de racemază este:

Alaninoracemaza

L-alanina → D-alanina

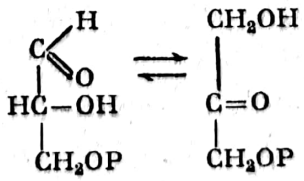
5.2. Exemplu de epimerază este:

Aldo-epimeraza

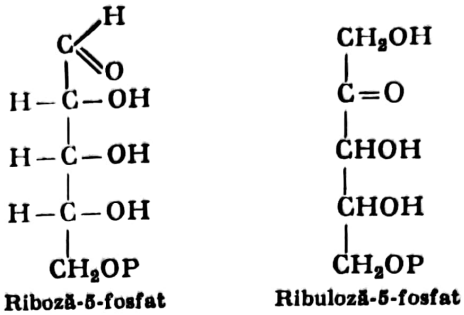
α-D-glucoza → β-D-glucoza

Alte enzime din categoria izomerazelor care prezintă interes sînt *oxido-reductazele intramoleculare:*

a) *triozofosfat izomeraza* care catalizează trecerea gliceraldehidei-3-fosfat în dihidroxiacetonă-fosfat:



b) *ribozo-fosfat izomeraza* catalizează trecerea riboză-5-fosfat în ribuloză-5-fosfat:



Riboză-5-fosfat — Ribuloză-5-fosfat

Ambele enzime împreună cu reacţiile lor sînt implicate în metabolismul glucidelor.

12.2.6. LIGAZELE

Ligazele, a şasea categorie în clasificare, sînt enzime care catalizează reunirea a doi compuşi într-unul singur. Ele conduc la formare de legături: C—C, C—O, C—S şi C—N, în reacţii cuplate cu ATP (de cele mai multe ori).

1) *Ligaze formînd legături* C—C:

Piruvat-carboxilaza

$$ATP + CH_3-CO-COOH + H_2O + CO_2 \rightarrow HOOC-CH_2-CO-COOH + ADP + P_i$$

Această ligază catalizează reacţia inversă celei catalizate de piruvat-decarboxilază (liază menţionată anterior).

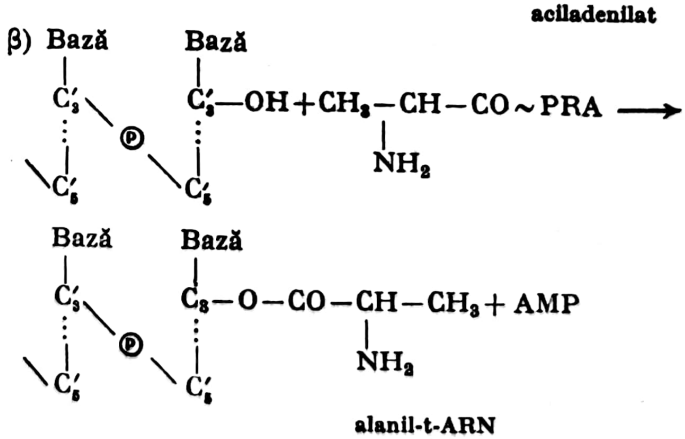
2) *Ligaze formînd legături* C—O:

Alanil t-ARN-sintetaza

α) $CH_3-CH(NH_2)-COOH + \underbrace{A-R-P\sim P\sim P}_{ATP} \rightarrow PP + CH_3-CH(NH_2)-CO\sim P-R-A$

aciladenilat

β)



alanil-t-ARN

Reacţiile prezintă interes în biosinteza proteinelor.

3) *Ligaze formînd legături* C—S:

Acil-CoA-sintetaza

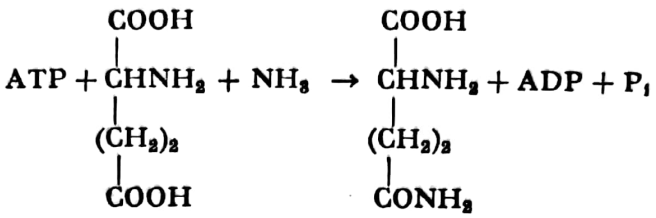
$$CH_3-(CH_2)_{14}-COOH + HS-CoA + ATP \rightarrow CH_3-(CH_2)_{14}-CO\sim SCoA + AMP + PP.$$

Reacţia este importantă în metabolismul lipidelor.

Scanned with OKEN Scanner

4) *Ligaze formînd legături* C—N:

Glutaminosintetaza



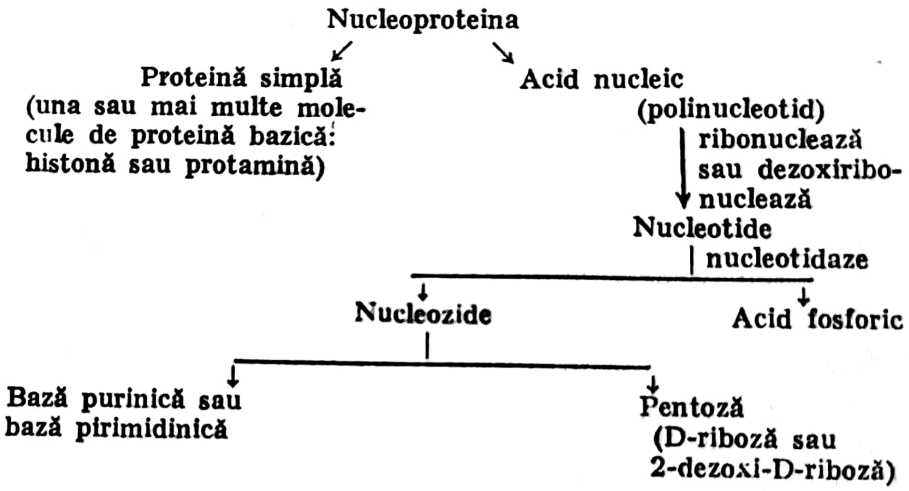
Această reacţie reprezintă un proces metabolic important studiat în cadrul metabolismului proteic.

ACIZII NUCLEICI

1. CONSTITUŢIA ACIZILOR NUCLEICI

Constituţia acizilor nucleici a ajuns să fie cunoscută odată cu constituţia nucleoproteinelor, în urma hidrolizei enzimatice a acestora.

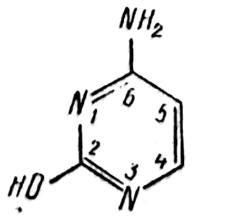
În schema următoare se menţionează enzimele specifice participante la procesul de hidroliză a nucleoproteinelor precum şi constituenţii rezultaţi (de la cei mai complecşi, la cei mai simpli):



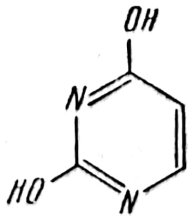
Din schema precedentă rezultă că nucleotidele sînt constituenţii imediaţi ai acizilor nucleici şi că ele se desfac enzimatic în nucleozide şi acid fosforic. Prin hidroliză acidă, nucleotidele se pot desface în alt mod: eliberînd baza (purinică sau pirimidinică) şi esterul fosforic al pentozei.

1.1. BAZELE PIRIMIDINICE

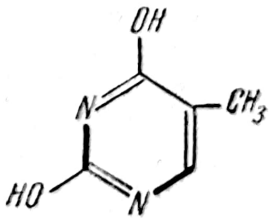
În constituţia acizilor nucleici intră următoarele trei baze pirimidinice: citozina (2-hidroxi-6-aminopirimidina), uracilul (2,6-dihidroxipirimidina) şi timina (2,6-dihidroxi-5-metil-pirimidina):



Citozină (forma lactim)



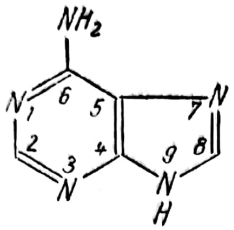
Uracil (forma lactim)



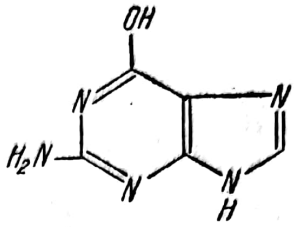
Timină (forma lactim)

1.2. BAZELE PURINICE

Bazele purinice din acizii nucleici sînt: adenina (6-aminopurina) şi guanina (2-amino-6-hidroxipurina):

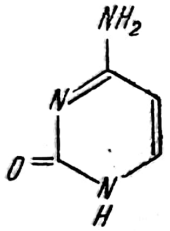


Adenina

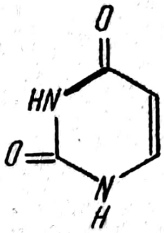


Guanina (forma lactim)

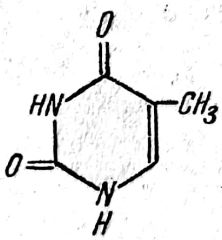
În constituţia acizilor nucleici, atît bazele pirimidinice cît şi baza purinică (guanina) funcţionează în formele lor lactam tautomere cu formele lactim. Acestea sînt următoarele:



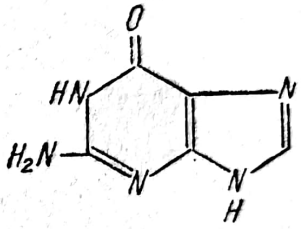
Citozină (forma lactam)



Uracil (forma lactam)



Timină (forma lactam)



Guanină (forma lactam)

Unitatea structurală a acizilor nucleici este nucleotidul. Un nucleoid este constituit din baza (purinică sau pirimidinică) unită β-glicozidic cu o moleculă de pentoză (riboza sau dezoxiriboza) ciclizată în forma furanozică şi fosforilată. În funcţie de aceste zaharuri intrînd în constituţia nucleotidelor, se deosebesc două tipuri de acizi nucleici: acizi ribonucleici, ARN (cu riboză) şi acizi dezoxiribonucleici, ADN (cu dezoxiriboză).

Ambele tipuri de acizi nucleici se găsesc în majoritatea celulelor în care au totuşi o localizare diferenţiată: ADN se află în nucleu iar ARN în citoplasmă (mai cu seamă în ribozomi şi mitocondrii).

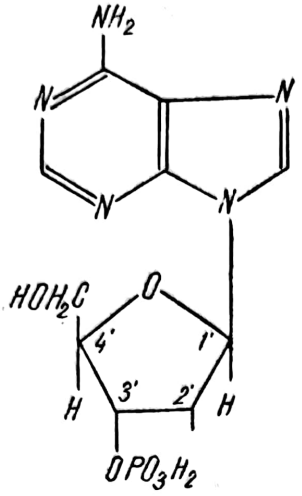
2. NOMENCLATURA NUCLEOTIDELOR ŞI A NUCLEOZIDELOR

2.1. NUMELE NUCLEOTIDELOR

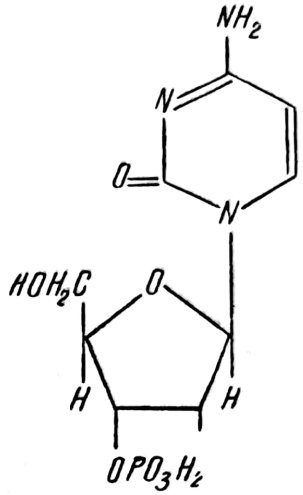
Aceste nume derivă din cel al bazei azotate componente, astfel: acid adenilic constituit din: adenină + riboză + acid fosforic; acid citidilic constituit din citozină + riboză + acid fosforic; acid uridilic constituit din: uracil + riboză + acid fosforic; acid timidilic, constituit din: timină + dezoxiriboză + acid fosforic.

Scanned with OKEN Scanner

În nucleotidele din acizii ribonucleici care se găsesc în drojdii, riboza — în formă furanozică — este fixată la atomul de azot din poziția 3 a bazei pirimidinice; restul de acid fosforic fiind fixat la atomul de carbon din poziția 3′ din pentoză:

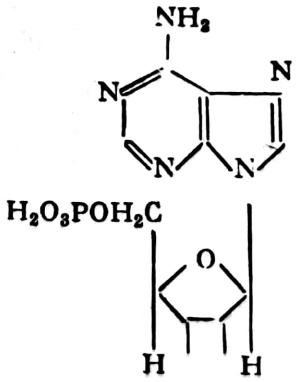


Acid adenilic din drojdie (Adenin-3′fosforibonucleotid)



Acid citidilic din drojdie (Citozin-3′-fosforibonucleotid)

În nucleotidele din acizii ribonucleici care se găsesc în organismele animale, ca și în acizii dezoxiribonucleici, pentoza este fixată în aceleași poziții ale bazelor ca și în acizii nucleici din drojdii dar restul de acid fosforic se află fixat la atomul de carbon din poziția 5′ din pentoză. Spre exemplu, acidul adenilic din timus are structura:



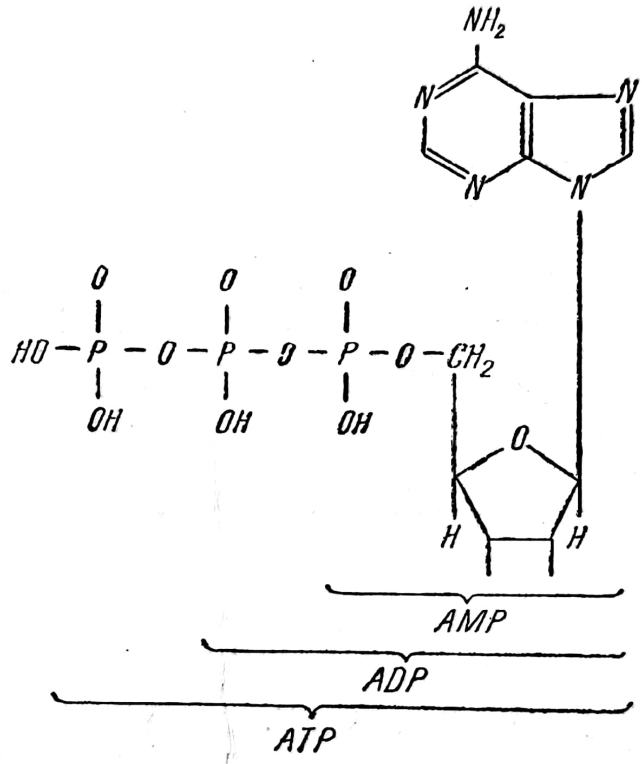
Acid adenilic din timus (Adenin-5′-fosfodezoxiribonucleotid)

Acidului adenilic din organismul animal — conținînd riboză esterificată cu acid fosforic la C_5, — i se mai spune și adenozinmonofosfat (AMP) căci cuprinde nucleozidul cu adenină (vezi mai departe definiția nucleozidelor) și un singur rest fosforic. În afară de acesta, în organismul animal joacă roluri biologice importante alte două substanțe cu structură asemănătoare acidului adenilic. Unul din acești compuși cuprinde la $C_{5'}$, din riboză un rest format prin deshidratarea a două molecule de acid fosforic (rest pirofosforic) iar

celălalt compus, un rest format prin două deshidratări între trei molecule de acid fosforic. Compuşii rezultaţi poartă nume corespunzătoare acestor constituţii: adenozindifosfat (ADP) şi adenozintrifosfat (ATP). Formulele lor sînt derivate imediat din formula adenozinmonofosfatului.

2.2. NUMELE NUCLEOZIDELOR

Prin hidroliza enzimatică (cu o nucleotidază) nucleotidele liberează acid fosforic şi trec în nucleozide. Deci acestea sînt combinaţiile formate din bază (purinică sau pirimidinică) şi pentoză (riboză sau dezoxiriboză). Numele nucleozidelor derivă tot din cel al bazelor componente. Astfel:



Adenozina, constituită din adenină+riboză.
Guanozină, constituită din guanină+riboză.
Citidina, constituita din citozină+riboză.
Uridina,constituită din uracil+riboză.
Timidina, constituită din timină+dezoxiriboză.
Dezoxiadenozina, constituită din adenină+dezoxiriboză.
Dezoxiguanozina, constituită din: guanină+dezoxiriboză.
Dezoxicitidina, constituită din: citozină+dezoxiriboză.

3. STRUCTURA ACIZILOR NUCLEICI

În acizii nucleici (polinucleotide) nucleotidele constituente sînt unite între ele prin resturile de acid fosforic. Acesta esterifică pe de o parte, oxidrilul alcoolic de la $C_{5'}$ al pentozei unui nucleotid şi oxidrilul de la $C_{3'}$ al pentozei nucleotidului vecin (precedent, în secvenţă). Rezultă în felul acesta lanţuri polinucleotidice în care bazele (purinice sau pirimidinice) ale nucleotidelor constituente apar ca grupări laterale (fig. V.1).

Scanned with OKEN Scanner

Elementele variabile într-un lanț polinucleotidic sînt natura și secvența bazelor azotate. În nucleotidele din ARN intră bazele: adenină, guanină, citozină și uracil iar în nucleotidele din ADN intră bazele: adenină guanină, citozină și timină.

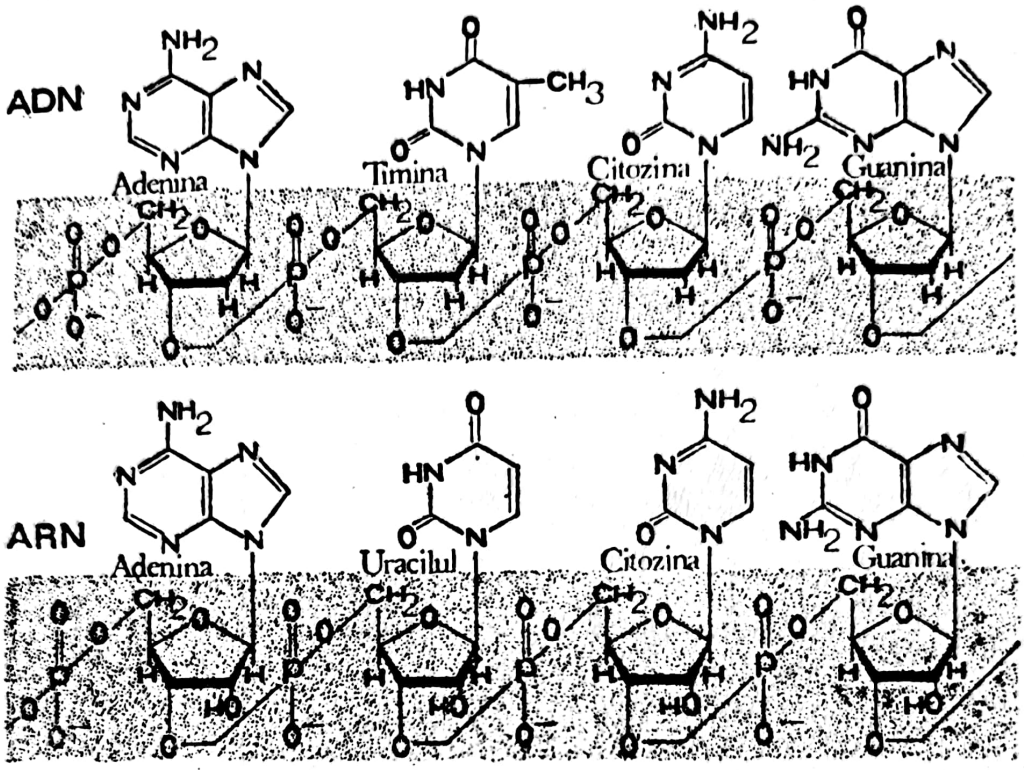


Fig. V.1. Înlănțuirea nucleotidelor în polinucleotide ADN și ARN.

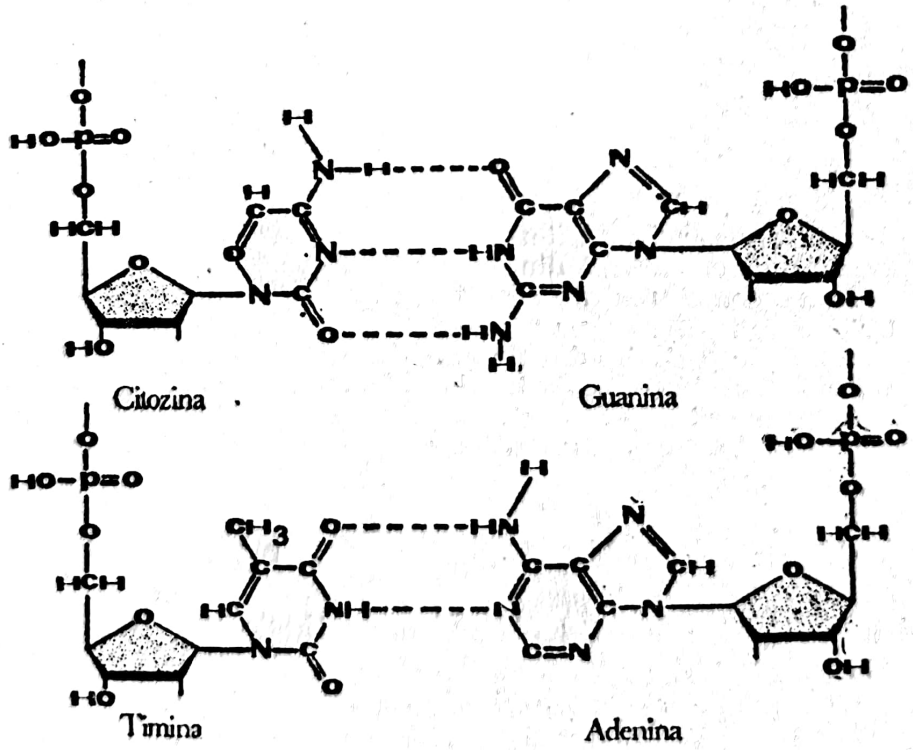


Fig. V.2. Legăturile de hidrogen între bazele azotate din ADN.

Deşi secvenţa bazelor nu este totdeauna cunoscută, s-a stabilit totuşi că în acizii dezoxiribonucleici adenina şi timina intră în aceeaşi proporţie iar guanina intră în aceeaşi proporţie cu citozina. Deci raporturile: $\frac{\text{Adeină}}{\text{Timină}}$ şi $\frac{\text{Guanină}}{\text{Citozină}}$ sînt unitare, numai raportul sumelor $\frac{\text{Adenină + Guanină}}{\text{Timină + Citozină}}$

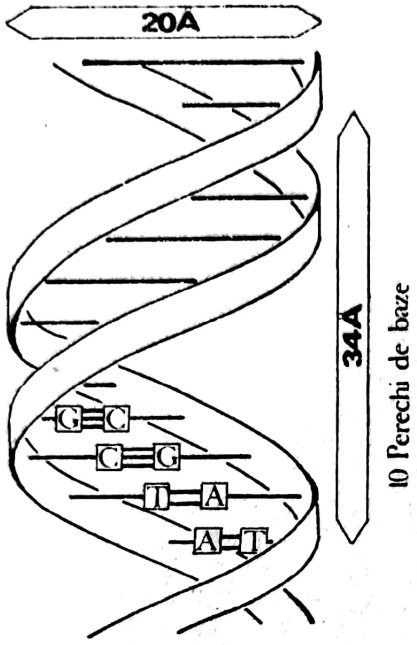


Fig. V.3. Dublu helix de ADN (reprezentare schematică).

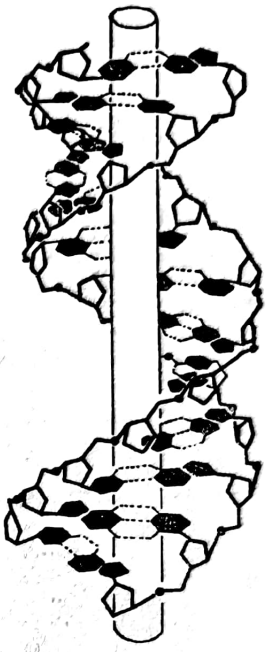


Fig. V.4. Dublu helix de ADN (reprezentare spaţială).

variază de la o specie la alta. Ţinînd seama de aceste raporturi şi de faptul că prin studiile de difracţie a razelor X s-a pus în evidenţă structura de dublu helix la ADN, Watson şi Crick au propus în 1953 structura dublu-helicoidală pentru ADN, în care două lanţuri polinucleotidice sînt înfăşurate cu bazele spre interiorul structurii, în aşa fel încît bazele aflate în aceeaşi proporţie se află faţă în faţă şi unite prin legături de hidrogen (fig. V.2).

După cum se vede, între citozină şi guanină se pot stabili trei legături de hidrogen iar între timină şi adenină două asemenea legături. Aceste legături de hidrogen stabilizează structura spaţială a dublului helix (fig.V.3 şi V.4).

4. GREUTĂŢILE MOLECULARE, LOCALIZAREA, SPECIILE ŞI ROLURILE ACIZILOR NUCLEICI

Acizii ribonucleici au greutăţi moleculare relativ mici, se găsesc în citoplasmă şi ca rol, participă la sinteza proteinelor. Acizii dezoxiribonucleici au greutăţi moleculare mari, se găsesc în cromozomii din nuclei şi împlinesc rolul de a fi depozitul caracterelor ereditare, atît la procariote cît şi la eucariote. În cazul virusurilor materialul genetic este reprezentat fie de acizi dezoxiribonucleici, fie de acizi ribonucleici.

Scanned with OKEN Scanner

4.1. SPECII MAI IMPORTANTE DE ACIZI NUCLEICI

4.1.1. ACIZII DEZOXIRIBONUCLEICI

Aceştia sînt numeroşi dar diferă între ei numai prin lungime (0,001—1 mm) şi secvenţa bazelor nucleotidelor din lanţuri. Au greutăţi moleculare cuprinse între 10^6 şi 10^9. Acizii ribonucleici sînt de trei specii (solubili sau de transport, ribozomali şi mesageri); ei diferă atît prin mărimea cît şi prin rolul pe care-l îndeplinesc în sinteza proteinelor.

4.1.2. ACIZII RIBONUCLEICI SOLUBILI (s-ARN) SAU DE TRANSPORT (t-ARN)

Ei sînt substanţe cu greutăţi moleculare mici (10 000—30 000) constituiţi din 70—100 resturi de nucleotide fiecare şi înşirate într-un singur lanţ. Li se spune „ARN-solubil" fiindcă se află dizolvaţi în citoplasmă. Numirea „ARN-solubil" este însă improprie deoarece toate speciile de ARN sînt solubile. Mai indicată este denumirea „ARN de transport" sau „de transfer",

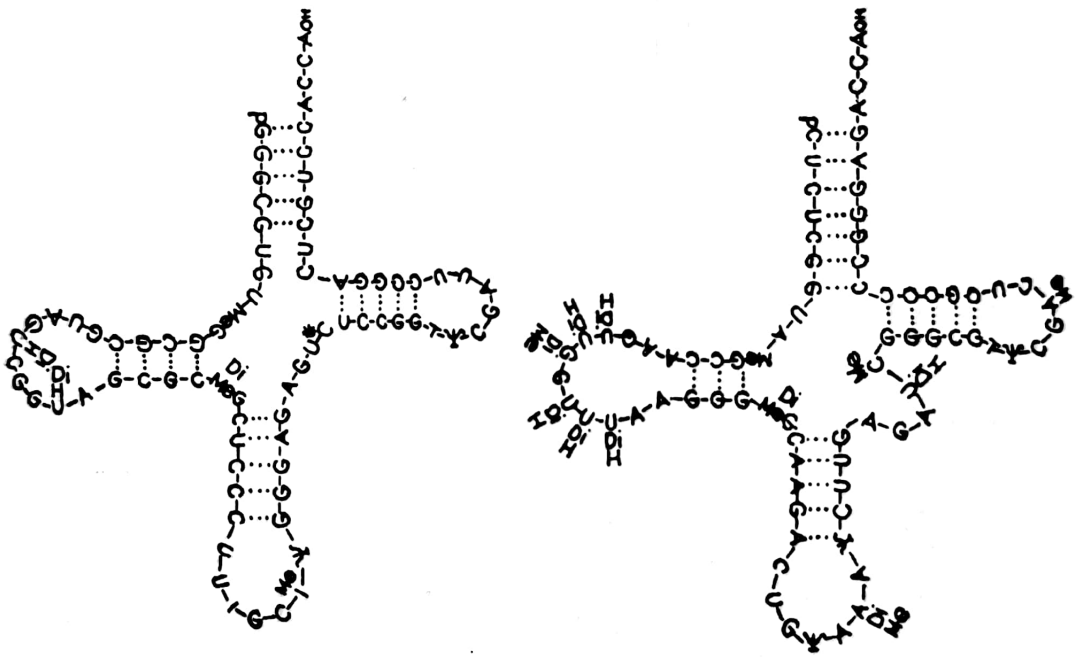
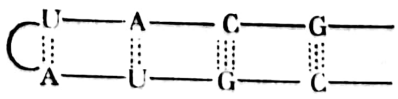


Fig. V.5. ARN-ul de transport al alaninei (în stînga) şi ARN-ul de transport al tirozinei (în dreapta).

fiindcă ei transportă aminoacizii (aflaţi de asemenea în citoplasmă) sub formă de complecşi t-ARN-aminoacid, la nivelul formaţiunilor pe care are loc unirea aminoacizilor în molecule proteice. Deşi acizii ribonucleici de transport sînt monocatenari, distribuţia spaţială a catenei permite formarea în cîteva regiuni din moleculă a unor veritabile bucle prin stabilirea legăturilor de hidrogen între baze complementare:



Datorită acestor posibilităţi, t-ARN al alaninei şi t-ARN al tirozinei iau formele spaţiale din figura V.5.

Scanned with OKEN Scanner

Majoritatea acizilor ribonucleici de transport a aminoacizilor au, ca şi cel care transportă alanina, forma spaţială de „frunză de trifoi". În toţi acizii ribonucleici de transfer la una din extremităţi se află ultimele 3 mononucleotide cu bazele: citozină, citozină şi adenină. Pe nucleotidul cu adenină — de fapt pe adenozină — se fixează aminoacidul.

4.1.3. ACIZII RIBONUCLEICI RIBOZOMALI (r-ARN)

Sînt cei din ribozomi. Aceştia sînt particule submicroscopice intrînd în constituţia citoplasmei şi la nivelul lor are loc biosinteza proteinelor. Există trei tipuri de acizi ribonucleici ribozomali deosebiţi prin greutăţile lor moleculare: 5S (35×10^3), 16S (5×10^5) şi 23S (1×10^6). Structurile lor sînt, în parte, cunoscute; s-au pus în evidenţă — cu această ocazie — numeroase zone cuprinzînd nucleotide cu baze complementare unite prin legături de hidrogen care, ca şi în cazul acizilor ribonucleici de transfer, constituie bucle (fig.V.6). În ribozomi aceşti acizi ribonucleici sînt combinaţi cu proteine de diverse tipuri.

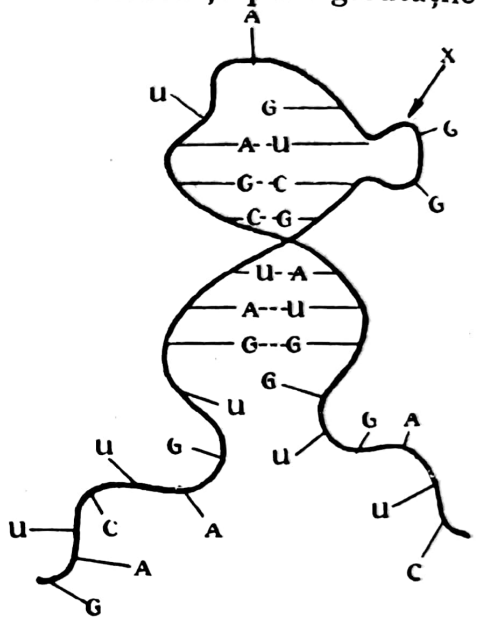


Fig. V.6. ARN-ul ribozomal.

4.1.4. ACIZII RIBONUCLEICI MESAGERI (m-ARN)

Ei au greutăţi moleculare de ordinul $1-15 \times 10^5$ şi transmit informaţia procesului de sinteză proteică de la cromozomii din nuclei, unde se formează m-ARN, pînă la ribozomii din citoplasmă unde are loc biosinteza proteică (vezi capitolul VI).

5. SINTEZA ACIZILOR NUCLEICI

Indiferent de specia căreia aparţin, atît acizii dezoxiribonucleici cît şi cei ribonucleici sînt sintetizaţi în organism din nucleotidele corespunzătoare. Biosinteza nucleotidelor are şi ea loc în organism în urma asamblării părţilor componente. Această asamblare precum şi sinteza bazelor purinice sau pirimidinice sînt prezentate în capitolul XII. În cele ce urmează se cercetează numai formarea polinucleotidelor din nucleotidele constitutive.

5.1. BIOSINTEZA ADN-ului

Această biosinteză este catalizată de sisteme enzimatice numite ADN-polimeraze care sînt active cînd în mediul de reacţie se află o cantitate mică de „tipar" sau „matrice" de ADN, toate cele 4 nucleotide specifice (acid adenilic, acid citidilic, acid timidilic, acid guanilic) sub formă trifosforilată (ATP, CTP, TTP şi GTP), precum şi ioni Mg^{2+}. Procesul este schematizat în fig. V.7. După cum se observă din schemă, în urma biosintezei efectuate prin acest mecanism, se obţine un acid dezoxiribonucleic bicatenar. Sinteza este totdeauna mai intensă dacă ADN-ul care serveşte ca matrice a fost în prealabil disociat în cele două catene constitutive (mai înainte de a fi introdus în mediu). Din schemă mai rezultă că în timpul sintezei, fiecare lanţ iniţial (din matrice)

Scanned with OKEN Scanner

își formează, pe seama nucleozidelor trifosforilate din mediu, un al doilea lanț. Aranjarea lor în acest lanț se face astfel ca bazele nucleozidelor să corespundă bazelor nucleotidelor din lanțul inițial, conform relației:

adenină ↔ timină și guanină ↔ citozină.

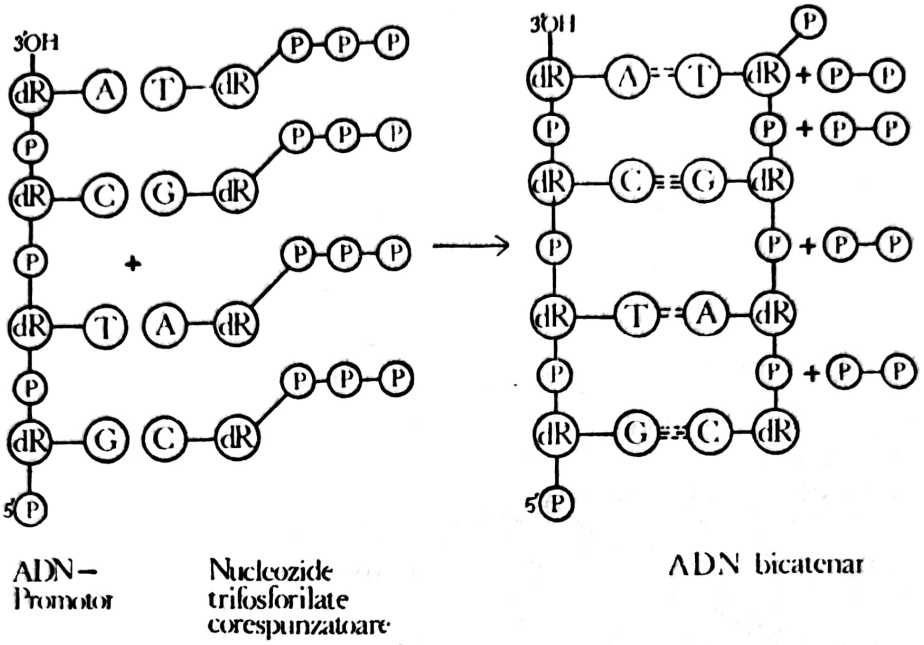


Fig. V.7. Schema biosintezei ADN-ului sub acțiunea ADN-polimerazei.

Fenomenul de „replicare", după tiparul ADN matriceal introdus în mediu se poate schematiza ca în fig. V.8.

Din fig. V.8 reiese că replicarea ADN-ului este semiconservativă deoarece fiecare moleculă de ADN rezultată are o catenă din molecula de ADN din care provine.

5.2. BIOSINTEZA ARN-ului

Pentru biosinteza ARN-ului există două serii de sisteme enzimatice: sistemul polinucleotidfosforilazei și sistemul ARN-polimerazei.

5.2.1. SISTEMUL POLINUCLEOTIDFOSFORILAZEI

Enzima înlesnește lungirea unui lanț de polinucleotide preexistent. Pentru a avea loc — în aceste condiții — formarea polinucleotidelor trebuie ca alături de un „tipar" (nu prea complex) să existe nucleotidele caracteristice sub formă de nucleozide difosforilate precum și ioni Mg^{2+}. Procesul poate fi schematizat astfel:

$$n(\text{bază-riboză-P-P}) + \xrightarrow[\text{(polinucleotid fosforilaza)}]{Mg^{2+}+\text{ARN-tipar}} (\text{bază-riboză-P})_n + nP_i$$

Enzima înlesnește adăugarea la tipar, unitate cu unitate, a nucleotidelor. Dacă în mediu există un singur fel de nucleotide se formează — în urma acțiunii unei astfel de enzime — un polinucleotid care cuprinde foarte multe nucleotide de același fel (eventual, poliadenilic — așa cum nu există în organism). Sistemul polinucleotidfosforilazei se află în organismul bacteriilor.

Acesta funcţionează la fel cu cel al ADN-polimerazei atît ca mecanism de reacţie cît şi ca matrice (care poate fi ARN sau ADN) iar ionii activanţi sînt tot ionii Mg^{2+}. Deosebirea constă în aceea că trifosfonucleozidele participante sînt cele caracteristice ARN-ului.

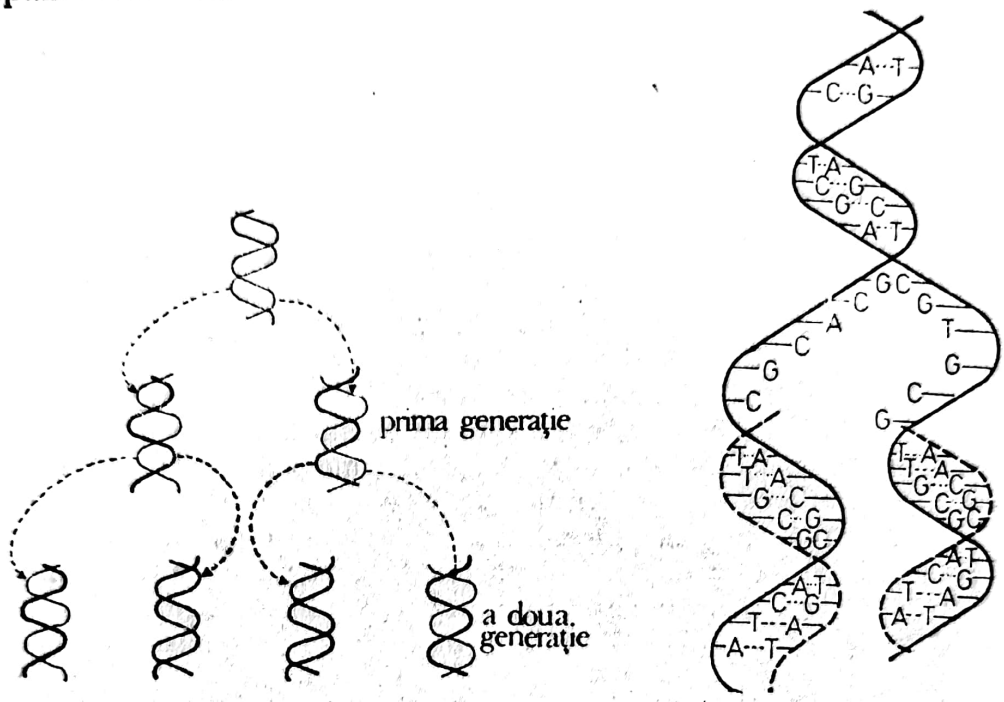


Fig. V.8. Replicarea ADN-ului.

Prin acest mecanism de reacţie şi cu acest sistem enzimatic se sintetizează *ARN-ul mesager* (m-ARN) (fig. V.9). Se spune că prin asemenea biosinteză a avut loc „transcrierea" sau „transcripţia" de ADN matriceal, gene-

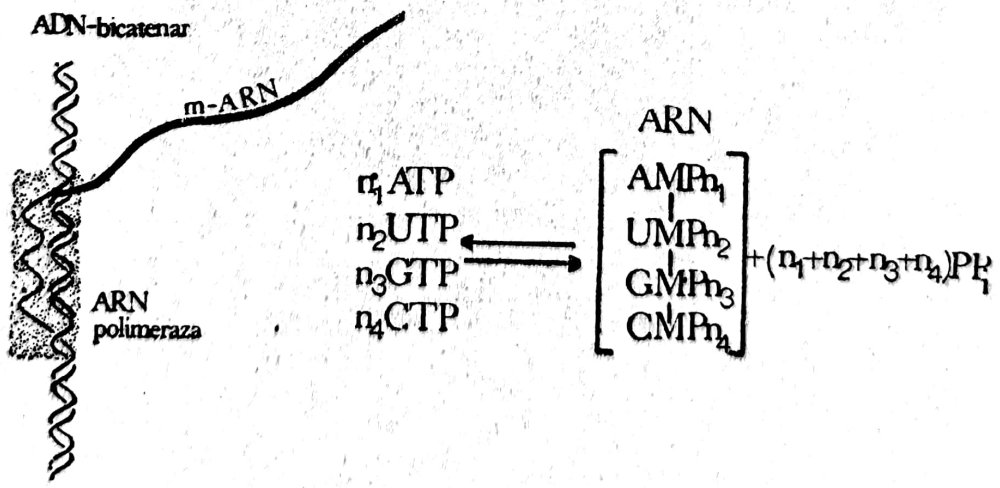


Fig. V.9. Biosinteza ARN-ului sub acţiunea ARN-polimerazei.

tic, în ARN mesager. Acizii ribonucleici mesageri, astfel formaţi, iau parte ulterior la biosinteza proteinelor, aşa cum se arată în capitolul VI.

Alte date referitoare la constituirea acizilor nucleici şi la participarea lor în procese biologice fundamentale sînt prezentate în capitolul VII.

Scanned with OKEN Scanner

BIOSINTEZA PROTEINELOR

1. NECESITATEA SINTEZEI PROTEINELOR ÎN ORGANISM

Celulele tuturor ţesuturilor din organism cuprind în constituţia lor proteine. Se ştie însă că în regnul animal nu există structuri fără funcţii şi nici un act vital nu are loc fără participarea proteinelor cu un rol funcţional bine definit (enzime, hormoni). Dar, orice funcţie presupune uzură. Spre exemplu, pielea, mucoasa tractului digestiv se descuamează, proteinele secreţiilor digestive se degradează şi se elimină pe cale intestinală. Se uzează sau se denaturează şi proteinele citoplasmatice. Pe de altă parte, unele din proteinele cu roluri structurale se îndepărtează şi ele; spre exemplu, părul şi unghiile (prin tăiere). Prin urmare, indiferent de rolul precumpănitor pe care-l împlinesc (structural sau funcţional), proteinele din organism se uzează, se dislocă şi se elimină. De aceea, ele trebuie să fie înlocuite.

În afară de înlocuirea proteinelor uzate din ţesuturile existente în organism, adesea este nevoie să se formeze ţesuturi noi. Spre exemplu, în organismele tinere care cresc sau în organismele adulte aflate în situaţii speciale (gestaţie, alăptare). Pentru toate aceste nevoi organismul face apel la aminoacizii de origine endogenă şi exogenă aflaţi în sînge. După ce se asigură cu o parte din ei concentraţia normală a aminoacizilor liberi din sînge (aminoacidemia) de 5—8 mg/100 ml, o altă parte din aminoacizi sînt duşi de sînge la ficat unde se sintetizează proteine specifice parenchimului hepatic — în mai mică măsură — şi proteine serice, în măsură mai mare. Sîngele vehiculează aceste proteine proprii la ţesuturile care au nevoie să-şi repare uzura. La nivelul acestor ţesuturi proteinele serice se dislocă şi din aminoacizii lor se sintetizează proteinele specifice ţesuturilor respective. Aşadar, în organism există o netă interconversiune a proteinelor. Aceasta este o caracteristică a metabolismului proteinelor în organismele vii. O altă caracteristică este aceea că în organismele vii nu există rezerve de proteine (cum sînt glicogenul sau lipidele de depozit). De fapt, însăşi inconversiunea proteinelor are loc datorită lipsei de rezerve.

2. UNITĂŢI FUNCŢIONALE CARE PARTICIPĂ LA BIOSINTEZA PROTEINELOR

2.1. m-ARN

Fiecare proteină este constituită din anumiţi aminoacizi aşezaţi în lanţurile polipeptidice într-o ordine bine determinată. Modul în care ajung să

Scanned with OKEN Scanner

fie „aleşi" aminoacizii pentru a rezulta o proteină cu anume structură precum şi controlul specificităţii şi al biosintezei proteinelor sînt realizate — calitativ şi cantitativ — în fiecare celulă, de către acizii dezoxiribonucleici din cromozomi. De fapt, secvenţa de aminoacizi dintr-o proteină este determinată de un fragment de acid dezoxiribonucleic care serveşte la „transcrierea" informaţiei genetice din ADN în m-ARN.

După ce s-a format ARN-ul mesager, acesta părăseşte cromozomii din nucleu şi trece în citoplasmă unde întîlneşte ribozomii şi, la nivelul lor, se desfăşoară biosinteza proteinelor.

2.2. RIBOZOMII

Ribozomii sînt particule subcelulare constituite fiecare din acizi ribonucleici (ribozomali, r-ARN) şi proteine. Prin ultracentrifugare s-a stabilit că ribozomii bacterieni au constanta de sedimentare 70S. În diverse condiţii experimentale ribozomii se desfac în cîte două unităţi cu constante de sedimentare respectiv, 50S şi 30S. La Escherichia coli fracţiunea 30S cuprinde 21 catene polipeptidice iar cea 50S 34 catene polipeptidice.

Din fracţiunea 50S s-a izolat un tip de r-ARN cu greutatea moleculară $1{,}6 \times 10^6$ (23S r-ARN) iar din cea 30S s-a obţinut un tip de r-ARN cu greutatea moleculară $0{,}6 \times 10^6$ (16S r-ARN). Studiile morfologice ale ultrastructurii ribozomilor, efectuate în ultimii 2—3 ani, au arătat că r-ARN este dispus în ribozom sub formă de filamente foarte fine.

Proteinele din constituţia ribozomilor au greutăţi moleculare cuprinse între 7 000 şi 32 000, cu o valoare medie 17 000. Majoritatea acestor proteine sînt foarte bogate în aminoacizi diaminomonocarboxilici (mai mult de 35%). În plus, ribozomii mai cuprind ioni Ca^{2+} şi Mg^{2+} care neutralizează sarcinile negative ale aminoacizilor din proteinele constituente.

Cu privire la structura ribozomilor sînt de subliniat următoarele: în cursul evoluţiei speciilor structura ribozomilor s-a modificat (ca proprietăţi şi tipuri de aminoacizi), astfel încît ribozomii provenind de la eucariote sînt diferiţi de cei proveniţi de la procariote. Cu toate acestea, rolul ribozomilor în biosinteza proteinelor (cel mai important rol al lor) este acelaşi în toate organismele. Acest fapt ridică însă întrebarea: cum este posibil ca structuri atît de complexe ca ribozomii, în care interacţionează numeroase proteine şi diverşi r-ARN, să se poată modifica aşa de mult, fără a afecta cu nimic funcţia vitală? Deocamdată nu se poate da un răspuns mulţumitor acestei chestiuni deoarece, în afară de ribozomii din Escherichia coli, structura ribozomilor celorlalte specii nu este încă suficient de bine cunoscută. La nivelul ribozomilor aminoacizii care urmează să se unească, ajung sub formă de complecşi cu ARN de transfer; fiecare aminoacid cu cîte un t-ARN.

2.3. t-ARN

S-a menţionat mai înainte că aminoacizii ribonucleici de transfer sînt constituiţi, fiecare, din nucleotide cuprinse într-un singur lanţ, cu distribuţie spaţială bine determinată, prezentată schematic în fig. V.5. În bucla centrală a acizilor ribonucleici de transfer rămîn totdeauna nucleotide cu baze neîmperechiate. Ele constituie pentru fiecare t-ARN ceea ce se numeşte

Scanned with OKEN Scanner

„anticodonul" aminoacidului pe care-l transferă. Spre exemplu, anticodonul alaninei este constituit de tripletul IGC (fig. V.5). Semnificaţia termenului de anticodon rezultă imediat din faptul că atunci cînd aminoacidul unit cu ARN-ul său de transfer ajunge pe ribozom, bazele tripletului de nucleotid neîmperechiate din t-ARN se unesc prin legături de hidrogen cu bazele complementare ale unui triplet din secvenţa de nucleotide care constituie ARN-ul mesager (ajuns şi el la nivelul ribozomilor). Acest triplet din m-ARN constituie „codonul" aminoacidului. Ţinînd seama de faptul că m-ARN s-a format prin transcrierea ADN-ului genetic, se înţelege că codonul aminoacidului corespunde totodată unui triplet de nucleotide cu baze complementare din constituţia ADN-ului.

Fiecare aminoacid are unul sau mai mulţi codoni şi bineînţeles, unul sau mai mulţi anticodoni.

2.4. CODUL GENETIC

În tabelul VI.1 este reprezentat codul genetic în care se specifică pentru fiecare aminoacid, codonii corespunzători. În fiecare codon se respectă o anumită secvenţă a mononucleotidelor de la capătul $C_{5'}$ la capătul $C_{3'}$ (avînd bazele I, II, III). Această secvenţă corespunde sensului în care are loc transcrierea fragmentului de ADN în m-ARN.

I = baza primului nucleotid din codon.
II = baza nucleotidului al doilea din codon.
III = baza nucleotidului al treilea din codon.

Din examinarea codului genetic rezultă imediat că pentru 20 aminoacizi există 61 codoni, majoritatea aminoacizilor avînd mai mulţi codoni. Se observă însă că primele două nucleotide din codonii unui aminoacid sînt aceleaşi iar al treilea nucleotid este diferit (fiind unul sau altul din nucleotidele cu baze purinice ori pirimidinice). Datorită variaţiei celui de al treilea nucleotid din codon se spune că codonul este degenerat. Această degenerare nu afectează valoarea biologică a codului genetic (aşa cum se arată în capitolul VII).

Tot din codul genetic, prezentat în tabelul VI.1, rezultă că deşi majoritatea aminoacizilor au mai mulţi codoni, un acelaşi codon nu corespunde mai multor aminoacizi. În sfîrşit, se observă că există şi trei codoni care nu codifică nici un aminoacid, indicînd sfîrşitul catenei polipeptidice biosintetizate.

Este de reţinut că s-a ajuns la cunoaşterea codului genetic în urma unor studii foarte minuţioase (Nierenberg, Leder, Khorana) efectuate în special la Escherichia coli. Repetarea cercetărilor (Sanger) la diverse specii bacteriene şi la animale, inclusiv la om, au condus la concluzia că pentru toate speciile este valabil un acelaşi cod genetic. Prin urmare, codul genetic este universal.

Cu privire la structura şi funcţionarea acizilor ribonucleici de transfer este necesar să se mai facă o precizare şi anume: deşi diverşi acizi ribonucleici de transfer diferă între ei prin secvenţa nucleotidelor componente, extremităţile lor sînt totuşi identice. Într-adevăr, capătul 5'-OH are drept nucleotid terminal guanozin-5'-fosfat, iar capătul 3'—OH are totdeauna două nucleotide cu bazele: citozină, citozină şi un nucleozid cu baza adenină. Restul de adenozină fiind ultimul din lanţ are grupul 3'—OH liber (deci nefosforilat). La nivelul acestui grup 3'—OH se fixează aminoacidul care urmează să fie transferat pe ribozom şi asamblat în lanţul polipeptidic.

Scanned with OKEN Scanner

Codul genetic

I	II				III
	U	C	A	G	
U	UUU, UUC } Phe UUA, UUG } Leu	UCU, UCC, UCA, UCG } Ser	UAU, UAC } Tyr UAA, UAG } Sfîrşit de catenă	UGU, UGC } Cys UGA } Sfîrşit de catenă UGG Trp	U C A G
C	CUU, CUC, CUA, CUG } Leu	CCU, CCC, CCA, CCG } Pro	CAU, CAC } His CAA, CAG } Gln	CGU, CGC, CGA, CGG } Arg	U C A G
A	AUU, AUC, AUA } Ile AUG Met	ACU, ACC, ACA, ACG } Thr	AAU, AAC } Asn AAA, AAG } Lys	AGU, AGC } Ser AGA, AGG } Arg	U C A G
G	GUU, GUC, GUA, GUG } Val	GCU, GCC, GCA, GCG } Ala	GAU, GAC } Asp GAA, GAG } Glu	GGU, GGC, GGA, GGG } Gly	U C A G

2.5. AMINOACIZII

Mai înainte de a se uni cu t-ARN aminoacizii suferă o activare în reacţie cu ATP-ul. Reacţiile implicate în proces sînt:

1) $R-CH(NH_2)-COOH + ATP \rightarrow PP + R-CH(NH_2)-C(=O)\sim \underbrace{OPRA}_{AMP}$

aminoaciladenilat

2) $R-P-R-P-R_{3'}-OH + ARPO\sim C(=O)-CH(NH_2)-R \rightarrow AMP + \ldots R-P-R-P-R-O-C(=O)-CH(NH_2)-R$

Enzima participantă la acest proces este o ligază numită aminoacil-t-ARN-sintetaza. Ea este specifică pentru fiecare aminoacid.

3. MECANISMUL BIOSINTEZEI PROTEINELOR

În biosinteza proteinelor desfășurată la nivelul ribozomilor se pot distinge trei etape principale: reacția de inițiere, formarea lanțului polipeptidic și reacția de încheiere a procesului (faza de oprire). La rîndul lor, aceste trei faze evoluează în mai multe etape (1—5) (ilustrate schematic în fig. VI. 1).

3.1. REACȚIA DE INIȚIERE

Aceasta constă într-un ansamblu de procese prin care se formează așa-numitul „complex de inițiere". El rezultă din parcurgerea etapelor 1 și 2, ilustrate în fig. VI. 1.

Etapa 1. Pe unitatea ribozomală 30 S se fixează un m-ARN. Fixarea acestuia este inițiată de doi factori de natură proteică F_1 și F_3.

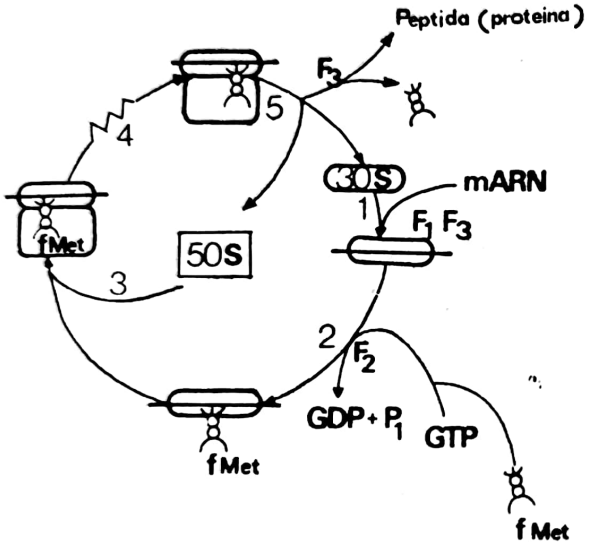
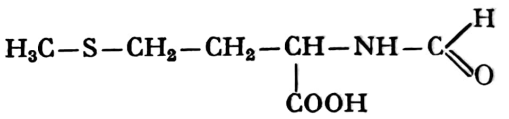


Fig. VI.1. Schematizarea mecanismului de biosinteză a proteinelor.

Etapa 2. Pe aceeași unitate ribozomală 30 S se fixează și un t-ARN care transportă un rest de N-formil-metionină:



Această fixare este inițiată de un al 3-lea factor de natură proteică, F_2. Legarea N-formil-metioninei de t-ARN (cu anticodonul AUG) are loc ca și în cazul fixării oricărui aminoacid de t-ARN-ul său caracteristic; reacțiile implicate într-un asemenea proces au fost scrise anterior. Bazele AUG ale tripletului de nucleotide neîmperecheate din t-ARN stabilesc legături de hidrogen cu bazele complementare (UAC) ale primelor trei nucleotide din m-ARN. Pentru desfășurarea întregului proces în această etapă este necesară și energia eliberată din desfacerea unei legături macroergice a GTP-ului.

3.2. FORMAREA LANȚULUI POLIPEPTIDIC

Aceasta are loc printr-un șir de procese, ilustrate schematic în etapele 3 și 4 din fig. VI. 1. În primul rînd, la complexul de inițiere se adiționează unitatea ribozomală 50 S, rezultînd astfel ribozomul funcțional. Acesta are două situsuri: unul în care se formează prin elongație catena polipeptidică numit situs peptidic (P) și altul în care se fixează noul aminoacil-t-ARN, numit situs aminoacidic (A) (fig. VI. 2).

Respectîndu-se regula corespondenței dintre tripletul următor de nucleotide din m-ARN și tripletul de nucleotide neîmperecheate ale unui al doilea ARN de transfer, acesta se atașează și el pe ribozomul funcțional (în situsul A). Însă cel de al doilea t-ARN transportă un anume aminoacid care admite ca

Scanned with OKEN Scanner

anticodon tripletul său de nucleotide neîmperecheate. În această situaţie (deci după fixarea celui de al doilea t-ARN) intervine o enzimă numită peptidiltransferaza care catalizează formarea unei legături peptidice între —COOH al restului de N-formil-metionină şi —NH_2 din aminoacidul transportat de al doilea t-ARN. Apoi are loc eliberarea primului ARN solubil — care a transportat iniţiatorul lanţului — şi se formează dipeptidil-t-ARN, în situsul P.

Îndată ce s-a format dipeptidil-t-ARN, un nou ARN solubil (al treilea t-ARN) cu aminoacidul său se fixează pe ribozom (în situsul A) formînd legături de hidrogen între tripletul de nucleotide neîmperecheate (anticodonul

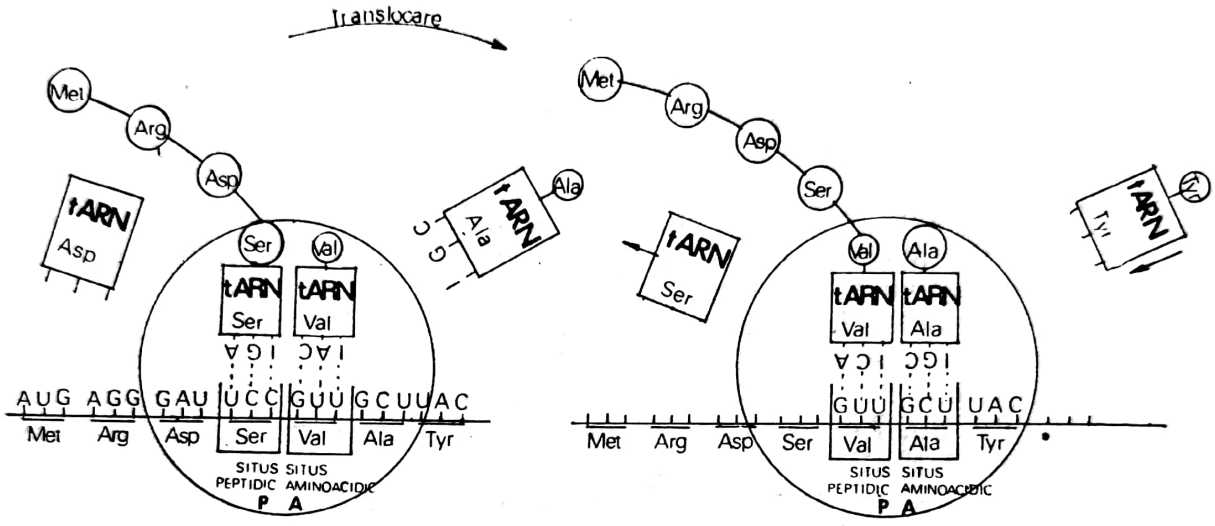
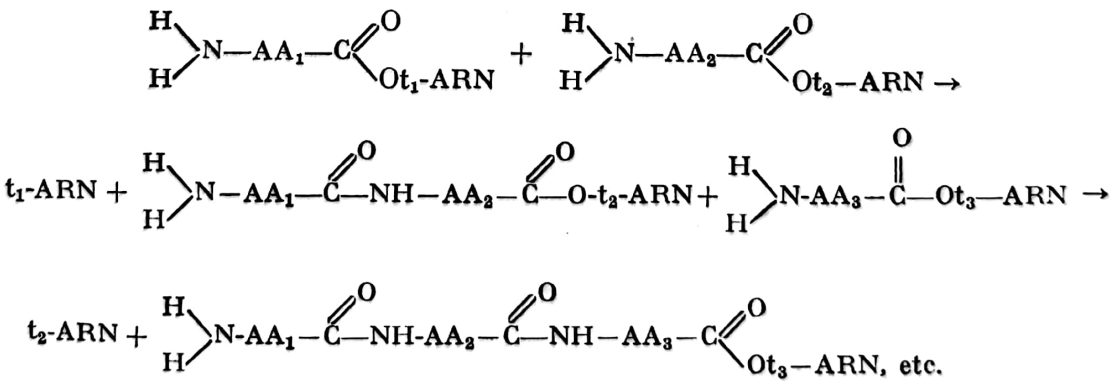


Fig. VI.2. Alungirea catenei polipeptidice.

celui de al 3-lea aminoacid) şi următorul triplet din m-ARN. Acest proces este posibil deoarece ribozomul funcţional lunecă încontinuu în faţa m-ARN-ului. Prin intervenţia peptidiltransferazei, de data aceasta se eliberează al doilea t-ARN şi rezultă tripeptidil-t-ARN, în situsul P şi aşa mai departe.

Desfăşurarea procesului de constituire a lanţului polipeptidic — prin unirea aminoacizilor — (AA) — mai poate fi prezentată şi astfel:



Trebuie precizat că pe măsură ce se formează lanţul peptidic el ia structura tridimensională (deşi continuă a fi ataşat de ribozomul funcţional).

Ţinînd seama de faptul că în cursul formării lanţurilor peptidice, ribozomii se deplasează de-a lungul moleculei de m-ARN succesiv — triplet cu tri-

Scanned with OKEN Scanner

plet — se înţelege că sinteza proteinelor se continuă pînă cînd se ajunge la un anumit triplet din m-ARN care nu codifică nici un aminoacid (UAA, UAG, UGA). În acest moment se semnalează sfîrşitul formării lanţului polipeptidic şi el se desprinde de pe ribozom.

3.3. REACŢIA DE OPRIRE

Aceasta corespunde etapei 5 din figura VI. 1. Îndată după „semnalizarea" sfîrşitului sintezei, restul N-formil-metionină — din capătul N-terminal al catenei polipeptidice formate — este îndepărtat pe cale enzimatică. Dacă însă lanţul conţine metionină la capătul N-terminal, nu se îndepărtează decît grupul formil, refăcîndu-se gruparea aminică. Sub acţiunea factorului F_3, imediat după desprinderea polipeptidului biosintetizat, se disociază fracţiunea ribozomală 50 S de fracţiunea 30 S; aceasta din urmă devenind aptă pentru participarea din nou în etapa 1-a, prin fixarea unui nou m-ARN etc.

În perioada 1963—1964 s-a observat că la sinteza unui anumit fel de lanţ polipeptidic informat de o moleculă unică de m-ARN participă mai mulţi (5—10) ribozomi; cu alte cuvinte, un m-ARN este traversat simultan de un lanţ de 5—10 ribozomi. Un asemenea lanţ de ribozomi se numeşte poliribozom sau polizom. Cînd un acelaşi m-ARN este parcurs de un polizom se ajunge la un moment dat ca m-ARN să fie cu capătul iniţial într-un ribozom şi cu cel final în ultimul. În acest moment în ultimul ribozom se asamblează capătul terminal al lanţului polipeptidic (cu aminoacidul C-terminal) (fig. VI. 3).

Acizii ribonucleici au viaţă scurtă; după ce contribuie la sinteza a 5—10 molecule de proteine ei se desfiinţează. În această situaţie se biosintetizează un nou m-ARN care determină o nouă sinteză proteică etc. Deşi numărul de molecule de m-ARN care informează sinteza proteică nu este foarte mare,

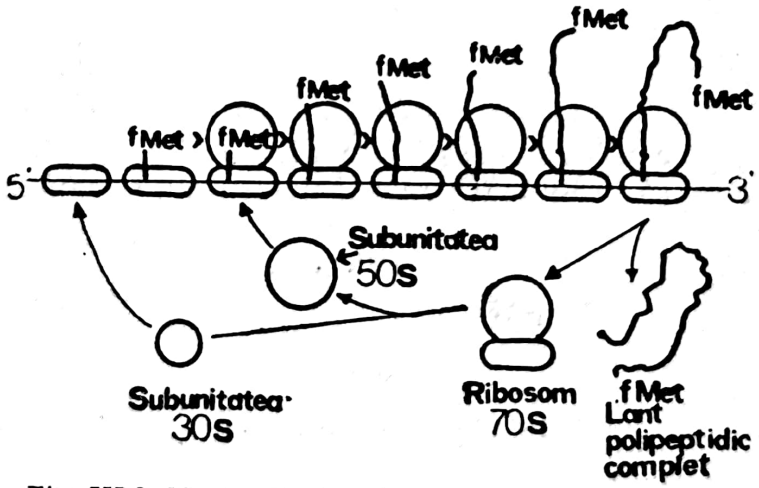


Fig. VI.3. Modul de funcţionare a unui polizom.

un singur m-ARN determină simultan (în mai mulţi ribozomi) sinteze proteice multiple. Procesul este foarte rapid; durează numai cîteva fracţiuni de secundă, deoarece într-o secundă se pot stabili 5 000—6 000 legături peptidice.

În ansamblu, întreg procesul de biosinteză al proteinelor poate fi caracterizat ca o transcriere a codului genetic din ADN, determinat de secvenţa bazelor, prin intermediul m-ARN-ului, într-o anumită secvenţă a aminoacizilor din proteine.

Scanned with OKEN Scanner

Fragmentele de ADN cromozomial care determină secvența aminoacizilor din proteine sînt prezente în toate celulele organismului, toată viața, dar sînt active numai în anumite momente. Aceasta înseamnă că biosinteza proteinelor nu se face oricum și oricînd ci este un proces reglat.

4. REGLAREA BIOSINTEZEI PROTEINELOR

Acest proces se realizează prin două mecanisme: inducția și represia.

4.1. INDUCȚIA

Inducția este un proces care stimulează biosinteza proteinelor și este exercitată de un inductor. Pentru a se înțelege mai bine în ce constă acțiunea unui inductor în procesul de biosinteză proteică, este util să se menționeze cîteva fapte care au demonstrat inducția biosintezei proteinelor enzimatice la bacterii. Acest proces, cunoscut sub numele de inducție enzimatică, este prezentat, pe scurt, în cele ce urmează.

4.1.1. INDUCȚIA ENZIMATICĂ

Se știe de multă vreme (de cca 65 ani) că microorganismele cultivate pe medii deosebite de cele obișnuite își constituie un echipament enzimatic care le permite dezvoltarea și pe aceste medii. Importanța fenomenului n-a fost relevată însă decît mult mai tîrziu (începînd din 1946), în urma lucrărilor lui J. Monod și ale școlii sale. În esență, cercetările au arătat că dacă Escherichia coli este cultivată pe un mediu din care lipsește lactoza (sau alt galactozid), microorganismul nu cuprinde decît 1—10 unități enzimatice/mg de β-galactozidază. Dacă însă se adaugă în mediu un galactozid, microorganismul ajunge să cuprindă pînă la 10 000 unități enzimatice/mg. Fenomenul descris este o inducție iar β-galactozidul este inductorul care stimulează biosinteza proteinei enzimatice, a β-galactozidazei. Într-adevăr, în prezența β-galactozidului, cantitatea de enzimă produsă este proporțională cu masa bacteriană și, totodată, cu cantitatea totală de proteine; ceea ce înseamnă că fiecare bacterie sintetizează aceeași cantitate de enzimă indusă. Din exemplul dat, rezultă că un substrat a determinat formarea unei cantități apreciabile de enzimă capabilă să acționeze asupra lui. S-a crezut că ar fi vorba de un fenomen de adaptare dar s-a demonstrat că analogi ai inductorului de tipul tiogalactozidelor (în care oxigenul din puntea glicozidică este înlocuit cu sulf) acționează și ei ca inductori, deși nu sînt substrate ale enzimei.

Cercetările au mai relevat că dacă o dată cu inductorul se adaugă în mediu și un inhibitor al sintezei proteice, enzima nu se mai formează, ceea ce conduce la concluzia că inducția implică sinteza „de novo" a enzimei. Presupunerea a fost confirmată deplin prin studii cu izotopi.

Este de remarcat că biosinteza indusă se produce rapid, la 1—2 minute după adăugarea inductorului în mediu, iar dacă se înlătură inductorul, biosinteza încetează tot într-un interval de 1—2 minute. Rapiditatea inițierii și încetării biosintezei a servit ca argument lui Jacob și lui Monod pentru

Scanned with OKEN Scanner

a prezenta teoria lor asupra sintezei și intervenției ARN-ului mesager în biosinteza proteică. Într-adevăr, s-a demonstrat că adăugarea inductorului determină, aproape imediat, sinteza de m-ARN specific proteinei enzimatice induse. Biosinteza enzimei nu se produce însă decît după începerea sintezei de m-ARN. Dacă se îndepărtează inductorul, sinteza de m-ARN se oprește și cum viața sa este foarte scurtă, cantitatea de m-ARN scade extrem de repede. La scurt timp după îndepărtarea inductorului sinteza enzimei încetează și ea. Cantitatea totală de enzimă rămîne constantă dar cantitatea de enzimă raportată la mg proteină scade repede căci bacteria crește în mod exponențial (fig. VI.4).

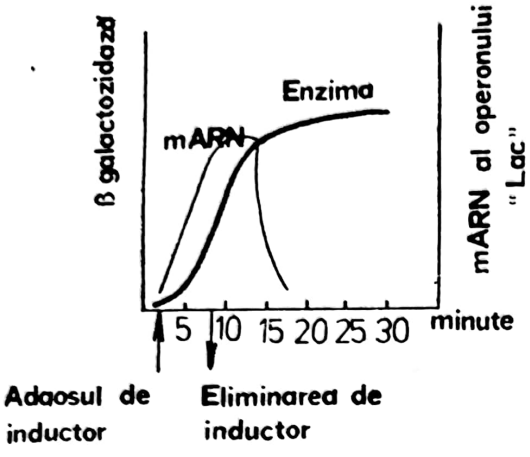


Fig. VI.4. Inducția și m-ARN.

Tiogalactozidul nu induce numai sinteza β-galactozidazei dar și biosinteza altor două enzime: a galactozidopermeazei — care catalizează pătrunderea activă a galactozidului în celulă — și a galactozidoacetilazei.

La microorngaisme s-au pus în evidență numeroși alți inductori. Spre exemplu, oxigenul induce formarea de citocromi la drojdii iar penicilina formarea penicilinazei la anumite microorganisme. Acest ultim caz este foarte interesant deoarece penicilinaza distruge antibioticul. Fenomenul de inducție în acest caz permite să se înțeleagă de ce anumite sușe microbiene sînt rezistente față de penicilină. De fapt, în cursul unui tratament cu antibiotice sușele care nu sînt inductibile se distrug iar cele care produc penicilinaza rezistă și se multiplică.

4.2. REPRESIA

Prin represie se înțelege diminuarea sau oprirea biosintezei proteinelo r datorită acțiunii unui represor. Ilustrarea acestui fenomen a fost făcută pentru prima oară tot la bacterii, furnizînd numeroase date importante. Acestea se desprind din observațiile următoare.

4.2.1. REPRESIA ENZIMATICĂ

O bacterie de tipul Escherichia coli poate să se dezvolte foarte bine pe un mediu care cuprinde clorură de amoniu — ca sursă de azot — și un singur compus organic (spre exemplu, glucoză) ca sursă de carbon. Pornind de la acești compuși aflați în mediu, bacteria sintetizează toți aminoacizii, bazele purinice și pirimidinice, glucidele și lipidele de care are nevoie pentru creștere, ceea ce înseamnă că bacteria este în măsură să manipuleze șiruri întregi de reacții metabolice, printre care și sinteze foarte complexe. Experiențele au dovedit că prin introducerea în mediul de cultură a unui aminoacid — spre exemplu, triptofanul — biosinteza lui se oprește. Acest fenomen, ca și inducția, a dat impresia — la început — că este un proces de adaptare, în sensul că bacteria nu sintetizează un aminoacid care este procurat de mediu. În realitate, același fenomen se poate produce introducînd în mediu un analog

Scanned with OKEN Scanner

al aminoacidului, neavînd aceleaşi proprietăţi biologice. Întreg fenomenul descris ilustrează represia enzimatică. S-a demonstrat că oprirea sintezei unui metabolit se datoreşte opririi sintezei enzimelor implicate în formarea lui. Aceste enzime sînt uneori foarte numeroase fiindcă substanţele (de hrană) adăugate mediului au structuri foarte îndepărtate de cele ale metabolitului final. Spre exemplu, dacă se schematizează sinteza triptofanului, notat ca metabolit final (E), prin şirul de reacţii:

$$A \xrightarrow[E_a]{} B \xrightarrow[E_b]{} C \xrightarrow[E_c]{} D \xrightarrow[E_d]{} E$$

în care A este substanţa adăugată mediului iar B, C şi D sînt intermediarii formaţi în proces, trecerea de la o etapă la alta se face cu participarea enzimelor E_a—E_d. Introducîndu-se în mediu triptofan, sinteza enzimelor este oprită, inclusiv a primei enzime care intervine în lanţul metabolic schematizat. La prima vedere, acest fenomen pare analog cu inhibiţia enzimatică prin feed-back. În realitate însă represia este diferită de inhibiţia prin feed-back deoarece în cazul represiei se opreşte biosinteza uneia sau mai multor enzime, pe cînd în inhibiţia prin feed-back are loc *inactivarea* (reversibilă a) unei enzime a cărei sinteză se poate desfăşura nestingherită. De fapt, în cazul represiei se opreşte sinteza ARN-ului mesager implicat în sinteza enzimei participante la formarea metabolitului represor. Spre exemplu, arginina din ciclul ureei, determină represia biosintezei ornitin-carbamil-transferazei, prima enzimă care intervine în reacţiile ciclului (vezi „ciclul ureei", în capitolul XI).

4.3. TEORIA OPERONULUI

4.3.1. REGLAREA BIOSINTEZEI PROTEINELOR LA PROCARIOTE

Pornind de la observaţiile menţionate în cazul inducţiei şi represiei enzimatice la bacterii, Jacob şi Monod au introdus o nouă noţiune, cea de *operon*, cu ajutorul căreia au explicat (în 1961) modul în care se exercită reglarea biosintezei proteinelor la procariote.

Semnificaţia termenului de operon se sesizează uşor luîndu-se în consideraţie faptul că în cuprinsul fiecărui ADN se află gene (sau cistroni) care sînt regiuni responsabile de sinteza lanţurilor peptidice. Dintre gene, unele sînt *structurale* iar altele *reglatoare*. Operonul conţine ambele feluri de gene şi le utilizează aşa cum se arată în fig. VI.5.

Genele structurale din operon conţin codurile corespunzătoare aminoacizilor din proteinele enzimelor care catalizează reacţii ale aceleiaşi secvenţe metabolice; spre exemplu, codurile aminoacizilor din enzimele participante la metabolismul lactozei în Escherichia coli. În fig. VI.5 se arată că operonul care reglează biosinteza enzimelor din metabolismul lactozei cuprinde trei gene structurale: *z* care este răspunzătoare de biosinteza β-galactozidazei, *y* care este gena specifică permeazei şi *a* care este corespunzătoare acetilazei.

Genele reglatoare (R) din operon conţin codurile corespunzătoare aminoacizilor din constituţia unei proteine numită aporepresor. Această proteină se poate combina cu un metabolit (din secvenţa reacţiilor catalizate de enzimele biosintetizate cu participarea genelor structurale) care se numeşte corepresor. Împreună, aporepresorul şi corepresorul exercită represia sinteze

Scanned with OKEN Scanner

proteinelor enzimatice participante la aceeaşi secvenţă metabolică. Este de reţinut însă că aporepresorul se poate combina şi cu inductorul care determină desfăşurarea sintezei acelorași proteine enzimatice. De fapt, aporepresorul poate exista în două forme alosterice; una este stabilizată de corepresor iar alta de inductor. Forma stabilizată de corepresor se poate combina cu un

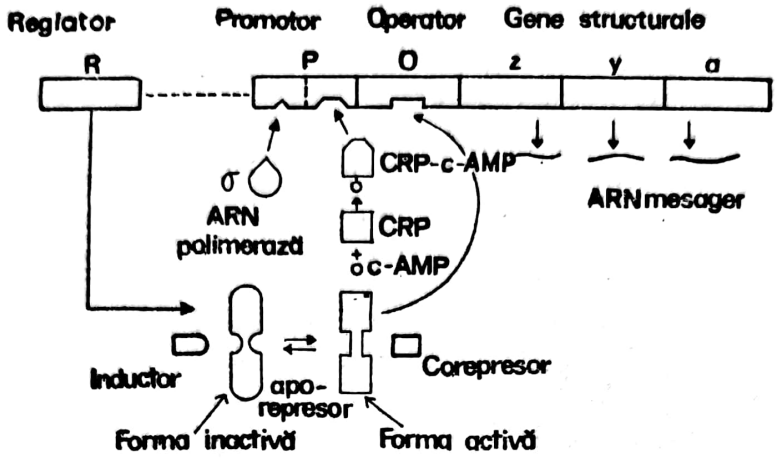


Fig. VI.5. Operonul lactozei.

al doilea tip de genă reglatoare numită genă operator (O). Aceasta se află în imediata vecinătate a genelor structurale şi „comandă" funcţionarea sau nefuncţionarea lor. Cînd gena operator este unită cu represorul (aporepresor + corepresor), funcţionarea genelor structurale se opreşte. Cînd însă aporepresorul este inactivat (prin combinare cu inductorul), unirea sa cu gena operator nu mai are loc şi aceasta „comandă" funcţionarea genelor structurale. În vecinătatea genei operator se află şi o genă promotor (P) care este mai complexă, în sensul că este constituită din două părţi cu roluri bine definite fiecare. Astfel, o parte din gena promotor serveşte la fixarea ARN-polimerazei care recunoaşte gena datorită subunităţii sale σ. Cealaltă parte din gena promotor permite fixarea unui complex format din c-AMP şi o proteină specifică receptoare pentru c-AMP (notată CRP în fig. VI.5). Prin urmare, c-AMP este indispensabil transcripţiei genelor structurale din operon dar el nu se poate fixa pe ADN la nivelul genei promotor decît prin intermediul proteinei specifice CRP. Într-adevăr, odată fixat complexul CRP—c—AMP, ARN-polimeraza îşi exercită rolul său catalitic transcriindu-se genele structurale din operon în ARN mesageri corespunzători şi, prin intermediul acestora, biosinteza proteinelor enzimatice poate avea loc.

Din cele menţionate, rezultă că teoria operonului explică foarte bine modul de funcţionare a operonului în reglarea biosintezei proteice. Pe de altă parte, numeroase studii efectuate pe bacterii au permis izolarea, purificarea şi analiza structurii multor aporepresori. De asemenea, studiile au dovedit că pentru reglarea biosintezei proteinelor enzimatice este necesar ca în echipamentul celular să existe şi să participe activ inductorul, corepresorul şi AMP-ul ciclic.

Printre operonii a căror funcţionare a fost mai bine studiată se numără cel al triptofanului care reglează biosinteza proteică a 4 enzime participante la sinteza triptofanului precum şi operonul histidinei care reglează biosinteza a 10 enzime implicate în formarea histidinei.

Scanned with OKEN Scanner

4.3.2. REGLAREA BIOSINTEZEI PROTEINELOR LA EUCARIOTE

Acest proces este diferit de cel întîlnit la procariote fiindcă celulele eucariotelor prezintă caracteristici deosebite: materialul genetic este închis într-un nucleu, deci este relativ izolat de mediul exterior, citoplasmatic;

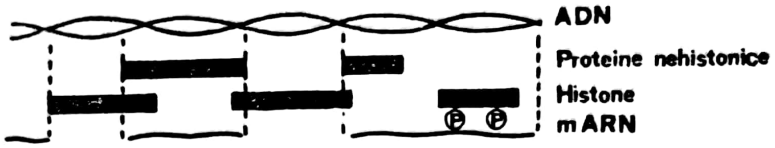


Fig. VI.6. Reglarea transcripției de către proteinele cromatinei.

celulele eucariotelor sînt specializate, ceea ce înseamnă că fiecare nu sintetizează decît o parte din proteinele sintetizate de întreg organismul și prin urmare, în fiecare celulă rămîne o parte din materialul genetic neexprimată; în celulele eucariotelor ADN-ul nu este liber ci într-o formațiune cuprinzînd și proteine.

Deoarece ADN-ul nu vine în contact cu mediul citoplasmatic, nu este surprinzător nici faptul că reglarea biosintezei proteinelor nu se face exact în același fel ca la procariote. O parte din reglare are loc în nucleu iar o parte are loc probabil într-o etapă ulterioară transcrierii. În cele ce urmează se arată cum are loc reglarea la nivelul nucleului.

În nucleu ADN-ul este înconjurat de două tipuri de proteine: histone și proteine acide (nehistone). Histonele sînt combinate cu regiuni din ADN care nu suferă transcripția sub acțiunea ARN-polimerazei. Proteinele care nu sînt histone se combină și ele cu ADN-ul dar împiedică inhibiția exercitată de histone asupra sintezei de ARN (fig. VI.6). Prin urmare, proteinele acide din nucleu, combinate cu ADN-ul, favorizează transcripția. Același efect îl au și histonele fosforilate. Într-adevăr, cînd histonele se fosforilează pe seama ATP-ului — în prezență de proteinkinază — ele își pierd capacitatea inhibitoare. Așadar, existența proteinkinazei și a unor proteine cromatiniene acide asigură controlul calitativ al transcripției în nucleu. Este de remarcat că proteinele acide (nehistone), combinate cu ADN-ul variază de la un tip de celule la altul, ceea ce explică — în parte — faptul că sinteza proteinelor nu se face la fel (nu este identică) în toate celulele.

4.4. REGLAREA HORMONALĂ

Intervenția hormonilor în biosinteza proteinelor, constă în special, în inducția sintezei unor proteine enzimatice. Ambele categorii de hormoni (azotați și steroizi) intervin eficient în proces. Cu toate acestea, inducția determinată de hormonii steroizi este mai bine cunoscută. Spre exemplu, cortizolul determină intensificarea sintezei tirozin-transaminazei și a triptofanpirolazei favorizînd sinteza de ARN mesageri, corespunzători ambelor proteine enzimatice. Estradiolul determină creșterea considerabilă a sintezei pentru numeroase proteine și ARN din țesutul uterin, activînd intens ARN-polimeraza. Același hormon determină și în ficatul păsărilor intensificarea biosintezei proteinelor din ou.

Scanned with OKEN Scanner

Capitolul VII

NOŢIUNI DE GENETICĂ MOLECULARĂ

1. INTRODUCERE

Genetica moleculară are ca obiect studiul diverselor procese de păstrare şi transmitere a informaţiei în lumea vie.

Cercetările biochimice din domeniul geneticii moleculare au început de mai multă vreme însă, datorită tehnicelor analitice moderne, ele au progresat în special, în ultimii 15 ani şi au condus la cunoaşterea multor date interesante. Acestea au servit la stabilirea unor veritabile mecanisme privitoare la păstrarea şi transmiterea informaţiei. Totodată, studiile efectuate pînă în prezent au permis şi sesizarea tulburărilor acestor mecanisme. Pe de altă parte, cercetarea tulburărilor a ajutat la o mai bună conturare a proceselor normale şi a permis aprofundarea lor.

Unele din noţiunile de genetică moleculară au fost expuse în capitolul V, privind acizii nucleici şi în capitolul VI, privind biosinteza proteinelor. În capitolul de faţă se prezintă o serie de date care întregesc noţiunile expuse anterior relevîndu-se, totodată, diverse particularităţi precum şi unele tulburări ale proceselor normale desfăşurate în organismele procariotelor şi eucariotelor.

2. MUTAŢII

2.1. NATURA MUTAŢIILOR

Se numeşte mutaţie o modificare ereditară a materialului genetic dintr-un organism. Ţinînd seama de faptul că ADN-ul reprezintă materialul informaţional pentru sinteza proteinelor, se înţelege că orice modificare (mutaţie) produsă în constituţia chimică a ADN-ului antrenează modificări în structurile şi chiar în funcţiile proteinelor. Datorită acestor repercusiuni, cunoaşterea şi studiul mutaţiilor prezintă un interes deosebit.

Mutaţiile pot fi spontane sau provocate în mod intenţionat sub acţiunea unor agenţi fizici (raze ultraviolete, raze X) sau chimici (acid azotos). Spre deosebire de mutaţiile care au loc sub influenţa agenţilor fizici şi care adesea se fac la întîmplare, mutaţiile provocate de agenţii chimici pot fi controlate şi dirijate în scopul obţinerii unor regiuni cu structuri anormale în ADN şi — ca urmare — a unor proteine cu structuri anormale. Se exemplifică în cele ce urmează unele mutaţii determinate de agenţi chimici şi numite, în consecinţă, mutaţii chimice.

Scanned with OKEN Scanner

2.2. MUTAŢIILE CHIMICE

2.2.1. MUTAŢII PROVOCATE DE ACIDUL AZOTOS

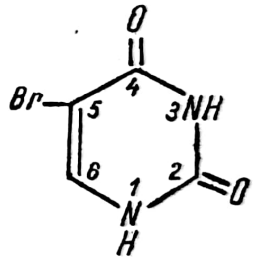
Acidul azotos transformă grupările aminice în grupări hidroxil:

$$R-NH_2+HNO_2 \rightarrow R-OH+N_2+H_2O$$

Sub acţiunea acidului azotos, citozina este transformată în uracil. Datorită acestui fapt, la prima replicare a ADN-ului, uracilul se va uni prin punţi de hidrogen cu adenina din lanţul complementar iar la a doua replicare adenina se va împerechea cu timina stabilind punţi de hidrogen între ele. În felul acesta, ADN-ul va cuprinde perechea de baze T—A în locul perechii G—C. De asemenea, un codon cuprinzînd ACC, corespunzător treoninei, va deveni, în urma tratării cu acidul azotos, AUU, corespunzător izoleucinei. Acest fapt a fost dovedit în numeroase experienţe efectuate pe virusuri la care s-a constatat substituiri de aminoacizi în urma modificării de triplete — codoni prin mutaţii dirijate.

2.2.2. MUTAŢII PROVOCATE DE 5-BROMOURACIL

Dacă în locul timinei din molecula de ADN se încorporează analogul său, 5-bromouracil, la replicare, baza complementară va putea fi guanina şi nu numai adenina care este totdeauna baza complementară a timinei (sau uracilului în ARN).



5 – bromouracil

Într-adevăr, datorită caracterului electronegativ al bromului, hidrogenul de la N_3 va fi mobilizat — sub formă de proton şi va trece la atomul de oxigen de la C_4. În felul acesta se creează posibilitatea stabilirii unei punţi de hidrogen între oxigenul de la C_4 din 5-bromouracil şi oxigenul de la C_6 din nucleul pirimidinic al guaninei. Aceasta este a treia legătură de hidrogen pe lîngă celelalte două create între N_3 şi N_1 al guaninei şi între atomul de oxigen de la C_2 din 5-bromouracil şi N al grupării aminice din guanină (fig. VII.1).

În cazul împerecherii cu guanină, la a doua replicare în ADN va apare perechea G—C în locul perechii A—T normală.

2.3. MUTAŢIILE PUNCTIFORME

Se numesc mutaţii punctiforme modificările rezultate prin transformarea bazelor unei perechi de nucleotide din ADN. În funcţie de modul în care se realizează transformarea, se disting următoarele tipuri de mutaţii punctiforme:

2.3.1. MUTAŢII PRIN SUBSTITUŢIE

Acestea constau din înlocuirea unei perechi de baze (purinică-pirimidi-

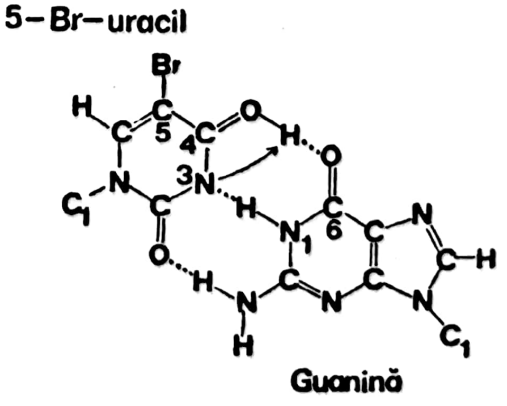


Fig. VII.1. Punţile de hidrogen dintre 5-bromouracil şi guanină.

Scanned with OKEN Scanner

nică) cu o altă pereche de baze (purinică-pirimidinică). Spre exemplu, A—T cu G—C, sau invers.

2.3.2. MUTAȚII PRIN INVERSARE

Ele constau în schimbarea bazei purinice și a bazei pirimidinice din perechea de nucleotide cu bazele lor complementare. Spre exemplu, perechea A—T cu T—A.

2.3.3. MUTAȚII PRIN SUPRIMARE

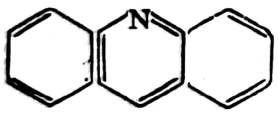
Aceste mutații constau în eliminarea unei perechi de nucleotide din ADN.

2.3.4. MUTAȚII PRIN INSERȚIE

Ele au loc prin introducerea unei perechi suplimentare de nucleotide în ADN.

Este de subliniat faptul că mutațiile prin suprimare și prin inserție au loc în cursul replicării moleculei de ADN și sînt determinate, de exemplu, de acridină și derivații săi.

Forma moleculară a acridinei (și a derivaților ei) este plată. Datorită acestui fapt, ea se poate intercala între cele două catene ale ADN-ului și anume, între planurile paralele care conțin nucleele bazelor purinice și pirimidinice. Ca urmare a intercalării acridinei, se distanțează bazele a două nucleotide alăturate din ADN iar molecula acestuia se distorsionează. Se înțelege că, în aceste condiții, la replicarea ADN-ului locurile ocupate inițial de acridină rămîn libere fiind echivalente fiecare, cu ale unei perechi de baze inexistente (mutație prin suprimare) sau în locurile respective se introduce cîte o pereche de baze aparținînd fiecare unui nucleotid suplimentar (mutații prin inserție).



acridina

2.4. CONSECINȚELE MUTAȚIILOR LA NIVELUL GENEI STRUCTURALE

În cazul mutațiilor prin substituție la nivelul genei structurale se pot prezenta următoarele trei situații:

2.4.1. MUTAȚIE BENIGNĂ

Substituția interesează baza celui de al treilea nucleotid dintr-un codon. După cum s-a mai menționat (vezi capitolul VI), acest fapt nu schimbă semnificația codonului și, prin urmare, în proteina care urmează să se sintetizeze, se codifică același aminoacid. Altfel spus, proteina codificată într-o anumită regiune de gena structurală mutantă este identică cu proteina codificată în aceeași regiune de gena structurală normală. În acest caz se spune că a avut loc o mutație „benignă" sau „liniștită".

Scanned with OKEN Scanner

2.4.2. MUTAȚIE NEUTRĂ

Substituția bazei unui nucleotid din codon antrenează schimbarea codonului unui aminoacid cu codonul unui aminoacid foarte asemănător. Spre exemplu, leucina (cu codonul CUC) cu izoleucina (cu codonul AUC). Proteina codificată într-o regiune neimportantă din punct de vedere structural de către gena structurală mutantă se deosebește de proteina codificată în aceeași regiune de către gena normală dar proprietățile biologice ale celor două proteine nu se deosebesc în mod sensibil. Asemenea mutație se numește „neutră" și se întîlnește adesea cînd se compară structurile primare ale unei aceleiași enzime la specii animale diferite.

2.4.3. MUTAȚIE NOCIVĂ

Aceasta se aseamănă ca mecanism cu mutația neutră dar substituția bazei unui nucleotid din codon determină schimbarea unui aminoacid într-o regiune importantă din punct de vedere funcțional al proteinei respective. Spre exemplu: un aminoacid aflat în centrul activ al enzimei, un aminoacid care participă la formarea legăturilor intra- sau intercatenare ce consolidează structurile secundară și terțiară ale proteinelor sau un aminoacid aflat în zona de contact a subunităților unei proteine cu structură cuaternară. În toate aceste cazuri mutația prin substituție are ca rezultat pierderea proprietăților biologice fundamentale ale proteinelor. În cele ce urmează se dau două exemple de mutații nocive.

2.4.3.1. *Enzime inactive.* Se știe că absența unei singure enzime catalizînd o reacție metabolică, poate declanșa o boală ereditară de metabolism. Spre exemplu, în secvența reacțiilor metabolice la care participă compușii A, B, C, D formați unul din altul în ordinea:

$$A \xrightarrow{e_a} B \xrightarrow{e_b} C \xrightarrow{e_c} D \xrightarrow{e_d} E$$

sub acțiunea catalitică a enzimelor: e_a, e_b, e_c, e_d, produsul de reacție final, E, nu se formează iar C se acumulează în cantitate mare dacă e_c lipsește. Bineînțeles, dacă E este un produs important sau C este toxic, în organism se declanșează diverse manifestări patologice; eventual, foarte grave. În numeroase asemenea cazuri s-a evidențiat la bolnavii respectivi o proteină care precipita anticorpul preparat față de enzima normală e_c, dar care își pierduse întreaga sa activitate catalitică. Acestei proteine i s-a dat simbolul CRM (cross reacting material). Este foarte probabil ca la sinteza acestei proteine să se fi produs substituirea unui aminoacid din centrul catalitic al enzimei e_c, determinîndu-se astfel o mutație nocivă.

2.4.3.2. *Hemoglobinele anormale.* Azi se cunosc mai mult de 150 hemoglobine anormale corespunzătoare diverselor substituiri de aminoacizi, datorate, la rîndul lor, mutațiilor prin substituție la nivelul codului genetic. În funcție de locul pe care-l are aminoacidul substituit în catenele polipeptidice, unele hemoglobine sînt puțin diferite de cele normale și, prin urmare, nu determină tulburări grave în organism, altele determină tulburări minore, iar altele sînt net patologice deoarece proteina își pierde proprietățile sale caracteristice. Astfel, dacă substituția aminoacidului se face în regiunea în care se află hemul, fixarea oxigenului are loc anormal. Alteori, substituția

Scanned with OKEN Scanner

aminoacidului favorizează oxidarea Fe^{2+} în Fe^{3+}, rezultînd methemoglobina care nu mai are capacitatea de a transporta oxigenul. De asemenea, substituţia aminoacidului se poate face la joncţiunea dintre două subunităţi, ceea ce are ca rezultat disocierea monomerilor. În sfîrşit, substituirea aminoacidului poate fi plasată astfel încît se modifică structura terţiară a proteinei. Această situaţie de întîlneşte la hemoglobina drepanocitară, caracteristică anemiei cu celule în formă de seceră. După cum se arată în capitolul XIV privind biochimia sîngelui, în cazul acestei hemoglobine aminoacidul substituit este acidul glutamic din poziţia 6 a catenei β; el este înlocuit cu valină. Forma redusă a hemoglobinei drepanocitare este insolubilă şi precipită în globulele roşii, care se deformează — luînd formă de seceră — şi obstruează capilarele sanguine. Din cele menţionate aici şi după cum se va arăta în capitolul XIV, rezultă că există o întreagă patologie a hemoglobinei care îmbracă manifestări foarte variate. Bineînţeles, bolile corespunzătoare sînt ereditare.

Mutaţiile prin suprimare sau prin inserţie au consecinţe mult mai profunde asupra structurii proteinelor codificate de genele mutante. Aici nu se analizează în detaliu această problemă ci se semnalează numai unele situaţii anormale. Astfel, mutaţiile prin suprimare sau prin inserţie pot determina dispariţia sau apariţia unui triplet la capătul lanţului de ADN. Ca urmare, se poate declanşa sinteza unui nou lanţ polipeptidic (în cazul mutaţiei prin suprimare) sau se pot combina două proteine suprapuse (în cazul mutaţiei prin inserţie).

Alte mutaţii avînd loc pe fragmente mai largi de ADN au ca rezultat sinteza de proteine cu structuri profund modificate. Dacă proteinele respective au rol în diverse procese de reglare sau de control metabolic, se creează situaţii extrem de nocive pentru organism, eventual letale.

2.5. EVOLUŢIA PROTEINELOR

Numeroase studii au dovedit că proteinele omoloage provenite de la specii diferite — spre exemplu, insulina omului şi boului — prezintă structuri primare identice în cea mai mare parte din molecula lor, ceea ce înseamnă că majoritatea aminoacizilor constitutivi sînt identici. Aceeaşi situaţie se întîlneşte şi la ACTH sau alţi compuşi polipeptidici. Faptul că există totuşi şi aminoacizi diferiţi în proteinele omoloage din organismele mai multor specii, a dus la concluzia că în cursul evoluţiei speciilor, proteinele au suferit mutaţii; mai bine spus, mutaţiile care au avut loc la nivelul genelor structurale din ADN au determinat diferenţieri în structura proteinelor. De asemenea, dacă se compară citocromul c provenit de la numeroase specii, se constată că din 104 aminoacizi constitutivi, 35 sînt invariabili. Aceştia sînt tocmai aminoacizii aflaţi în regiunea catalitică enzimatică. Ceilalţi aminoacizi variază de la o specie la alta. Cu cît speciile sînt mai îndepărtate filogenetic, cu atît există mai mulţi aminoacizi deosebiţi.

În ceea ce priveşte hemoglobina, dacă se compară aminoacizii diverselor subunităţi ale unei aceleiaşi molecule de hemoglobină, se constată că atît catenele α cît şi cele β cuprind 65 aminoacizi identici. Catenele β şi γ nu diferă decît prin 37 aminoacizi.

Studiile de acest gen au dus la concluzia că în cursul evoluţiei se pot produce două fenomene: substituirea de aminoacizi şi dedublarea genelor.

Scanned with OKEN Scanner

În cazul substituirii aminoacizilor, dacă mutaţia s-a dovedit nocivă, ea a fost imediat sau în mod progresiv eliminată; dacă a fost neutră, nu a avut nici un efect în ceea ce priveşte supravieţuirea individului.

În cazul dedublării genelor, cele două gene formate au codificat la început proteine identice. Apoi, suferind fiecare mutaţii diverse, au codificat proteine

Tabelul VII. 1

Unităţile de evoluţie ale cîtorva proteine

Proteina	*Unităţi de evoluţie* (milioane ani)
Histona	600
Citocromul c	20
Hemoglobina	5,8
Fibrina	1,1

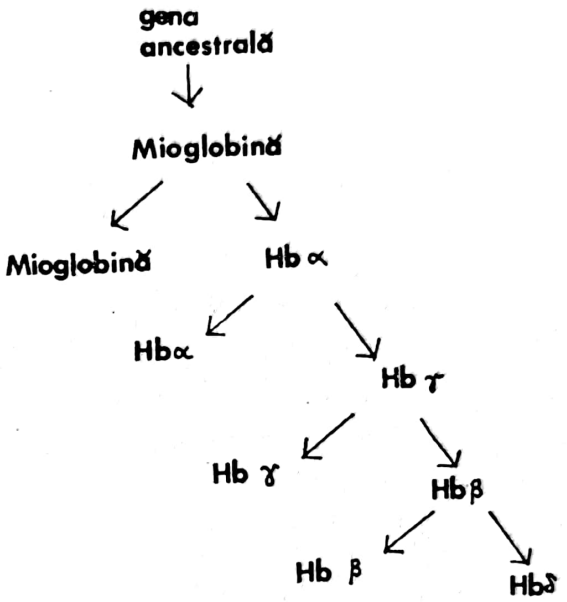


Fig. VII.2. Formarea diferitelor catene ale hemoglobinei în cursul evoluţiei.

diferite; cu atît mai modificate, cu cît mutaţiile au fost mai numeroase. Existenţa unei dedublări a genelor se sprijină şi pe faptul că cele două proteine diferite dar asemănătoare în ceea ce priveşte capacitatea de a fixa oxigenul, hemoglobina şi mioglobina, au o structură asemănătoare. De fapt, structura mioglobinei este foarte apropiată de cea a unei subunităţi din hemoglobină. În acest caz se admite că o genă iniţială (ancestrală) a dat naştere mioglobinei şi apoi, o dedublare a catenei s-a tradus prin formarea catenei α din hemoglobină iar o altă dedublare a condus la crearea catenei γ. Ulterior, a urmat dedublarea care a condus la catena β şi ultima dedublare a avut ca rezultat catena δ (vezi schema din fig. VII. 2). După cum rezultă din fig. VII. 2, cele două gene cu aceeaşi origine au evoluat independent una de alta şi au ajuns — pînă la urmă — să codifice proteine diferite dar cu atît mai asemănătoare cu cît dedublarea a fost mai recentă. După cum s-a mai menţionat, cînd o mutaţie este nocivă, ea devine letală. Gena structurală a unei anumite proteine poate suferi cu atît mai multe mutaţii, cu cît proteina respectivă are o funcţie biologică mai puţin importantă sau cuprinde aminoacizi care nu joacă roluri cheie în funcţia sa biologică.

Timpul necesar ca 1% din aminoacizii unei proteine să devină substituiţi se numeşte *unitate de evoluţie*. Acest timp se măsoară în milioane de ani. Din tabelul VII. 1 rezultă că acest timp variază foarte mult de la o proteină la alta, în funcţie de rolul ei biologic: este scurt pentru fibrină, este foarte lung pentru histonă — care controlează transcripţia genelor — şi este intermediar pentru citocromul c şi hemoglobină.

Semnificaţia datelor din tabelul precedent rezultă şi din următoarele precizări: considerînd că totalul mutaţiilor tuturor genelor este identic — şi

Scanned with OKEN Scanner

anume nociv, mutaţiile nocive ale histonei sînt mult mai numeroase decît ale citocromului c, ale acestuia sînt mai numeroase decît ale hemoglobinei, iar ale hemoglobinei mai numeroase decît ale fibrinei.

3. MECANISMUL ACŢIUNII ANTIBIOTICELOR

Antibioticele sînt substanţe care opresc creşterea sau chiar suprimă viaţa microorganismelor şi care sînt produse, ele însăşi, de unele microorganisme sau de ciuperci. În genere, antibioticele intervin la nivelul proceselor fundamentale din viaţa celulelor microbiene. Doearece aceste procese fundamentale sînt uneori comune cu cele din celulele animale, numeroase antibiotice nu sînt utilizate în terapeutică, fiind toxice.

Anumite antibiotice au acţiune anticanceroasă deoarece intervin în viaţa celulelor care se divid repede (bacterii, celule canceroase, celule precursoare ale globulelor roşii). Faptul că antibioticele intervin şi asupra celulelor din care rezultă globulele roşii, explică — în mare măsură — diversele accidente hematologice determinate de unele antibiotice. Pe de altă parte, faptul că antibioticele blochează anumite mecanisme moleculare face ca ele să fie utilizate tocmai în acest scop pentru diverse studii biochimice.

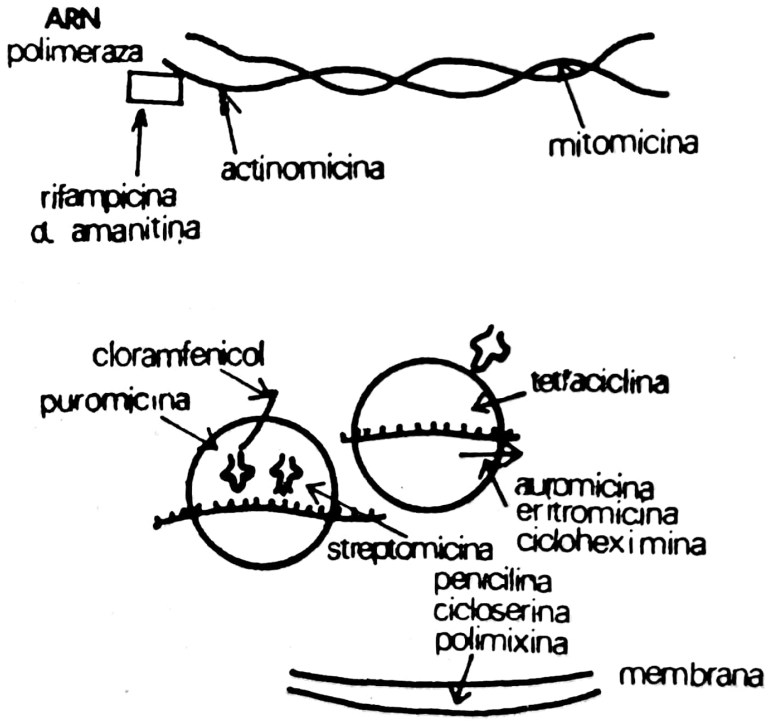


Fig. VII.3. Mecanismul acţiunii antibioticelor.

Antibioticele sînt numeroase şi intervenţia lor, la nivel molecular, este foarte variată (fig. VII.3). În cele ce urmează se exemplifică diversele categorii de antibiotice, specificîndu-se şi nivelul la care acţionează.

3.1. ANTIBIOTICE CARE SE OPUN DIVIZIUNII ADN-ului

Din această categorie face parte *mitomicina*. Ea are capacitatea de a se uni cu cele două catene complementare din ADN. Datorită acestui fapt, catenele

Scanned with OKEN Scanner

de ADN nu se mai pot separa şi, prin urmare, nu mai este posibilă replicarea. Unele antibiotice din acest grup au proprietăţi anticanceroase, opunîndu-se diviziunii celulelor tumorale.

3.2. ANTIBIOTICE CARE INHIBĂ TRANSCRIPŢIA

Aceste antibiotice sînt mai numeroase şi au o intervenţie specifică în oprirea transcripţiei. Astfel:

Actinomicina se combină cu ADN-ul, la nivelul guaninei şi împiedică transcripţia, implicit, formarea ARN-ului mesager. Datorită acţiunii sale, actinomicina este folosită ca substanţă anicanceroasă. De asemenea ea este folosită adesea în biochimie pentru studiul proprietăţilor moleculare ale anumitor compuşi şi pentru cercetarea metabolismului ARN-ului mesager. Astfel, pentru determinarea duratei de viaţă a m-ARN-ului, se injectează ^{32}P care marchează m-ARN-ul ce se biosintetizează şi apoi se injectează actinomicină care opreşte sinteza ulterioară de m-ARN. Se stabileşte apoi radioactivitatea m-ARN-ului în funcţie de timp şi din ritmul de scădere a radioactivităţii se calculează timpul de înjumătăţire (jumătate din durata de viaţă) a m-ARN-ului.

Rifampicina inhibă sinteza de m-ARN, combinîndu-se cu ARN-polimeraza la bacterii.

Amanitina extrasă dintr-o ciupercă, inhibă sinteza de m-ARN, combinîndu-se cu ARN-polimeraza, la ecuariote.

3.3. ANTIBIOTICE CARE INHIBĂ TRADUCEREA CODULUI GENETIC

Aceste antibiotice intervin în diversele etape ale procesului de traducere a mesajului genetic în secvenţe de aminoacizi din proteine. Astfel:

Tetraciclina inhibă transferul pe ribozomi al compuşilor rezultaţi din aminoacizi şi acizii ribonucleici de transfer (aminoacil-t-ARN).

Eritromicina la procariote şi *cicloheximida* la eucariote impiedică deplasarea ribozomilor în lungul m-ARN-ului.

Cloramfenicolul are o acţiune complexă deoarece împiedică atît fixarea de m-ARN pe ribozomi, cît şi formarea de legături peptidice între aminoacizii ajunşi la nivelul ribozomilor.

Puromicina are o structură foarte apropiată de a tirozil-adenozinei. Datorită acestui fapt, ea se comportă ca un analog al unui aminoacil-t-ARN şi are o mare afinitate pentru catenele polipeptidice în curs de dezvoltare. În consecinţă, puromicina, se combină cu peptidele aflate în situsurile respective pe ribozomi şi le detaşează de pe aceştia, împiedicînd astfel continuarea dezvoltării lanţurilor polipeptidice Este de remarcat că puromicina este un puternic inhibitor al sintezei proteice, atît în celulele bacteriene cît şi în cele animale. De aceea, puromicina nu este folosită în terapeutică ci este utilizată numai în studiile biochimice deoarece împiedică traducerea mesajului genetic dar nu şi transcripţia lui.

3.4. ANTIBIOTICE CARE INTERVIN ÎN CITIREA CODULUI GENETIC

Streptomicina. Printre alte proprietăţi ale sale, streptomicina are şi capacitatea de a modifica citirea codului genetic. Astfel, trinucleotidul cu bazele constituite exclusiv de uracil (poli-U) codifică în mod normal fenilalanina. În

Scanned with OKEN Scanner

prezența streptomicinei, se pot fixa pe ribozomi și leucil-t-ARN (codonii leucinei fiind CUU sau UUG) și izoleucina (cu codonul AUU). Se constată în aceste cazuri o diminuare a specificității tripletelor care se pot combina cu anticodoni ce nu cuprind două baze complementare.

O acțiune asemănătoare cu a streptomicinei au și *neomicina* și *kanamicina*.

3.5. ANTIBIOTICE CARE ACȚIONEAZĂ ASUPRA PERETELUI CELULAR AL BACTERIILOR

Peretele celulelor bacteriene este format din molecule complexe conținînd — printre altele — peptide ce cuprind aminoacidul D-alanina, considerat nenatural și diverse glucide. Aceste componente sînt dislocate din peretele celulelor bacteriene — în special — de către următoarele antibiotice: *penicilina* (cel mai vechi antibiotic folosit), *cicloserina* și *polimixina*.

4. BIOSINTEZA DE PEPTIDE FĂRĂ PARTICIPAREA RIBOZOMILOR

În unele sisteme biologice legătura peptidică se poate stabili între aminoacizi printr-un mod deosebit de cel studiat la biosinteza proteinelor. Acest mecanism deosebit poate fi ușor urmărit în cazul biosintezei gramicidinei S.

Gramicidina S este o peptidă ciclică, formată din două pentapeptide identice, unite cap la coadă (fig. VII.4). Ea are însușiri de antibiotic fiind produsă de bacteria numită Bacillus brevis.

Biosinteza gramicidinei S nu necesită prezența ribozomilor sau a vreunui m-ARN ci numai a două enzime, E_1 și E_2. Aceasta din urmă (cu greutate moleculară 100 000) activează D-alanina, în timp ce ceilalți 4 aminoacizi din unitatea pentapeptidei sînt activați de enzima E_1 (cu o greutate moleculară 180 000 daltoni).

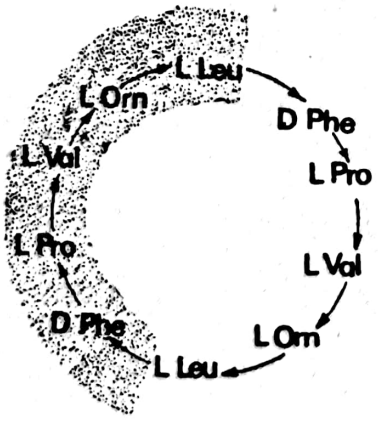


Fig. VII.4. Gramicidina S.

Aminoacizii sînt activați prin formarea de legături tioesterice cu enzima respectivă. De fapt, în cazul fiecărei enzime au loc reacțiile:

(1) $\text{aminoacid} + \text{ATP} \rightarrow \text{aminoacil} - \text{AMP} + PP_i$

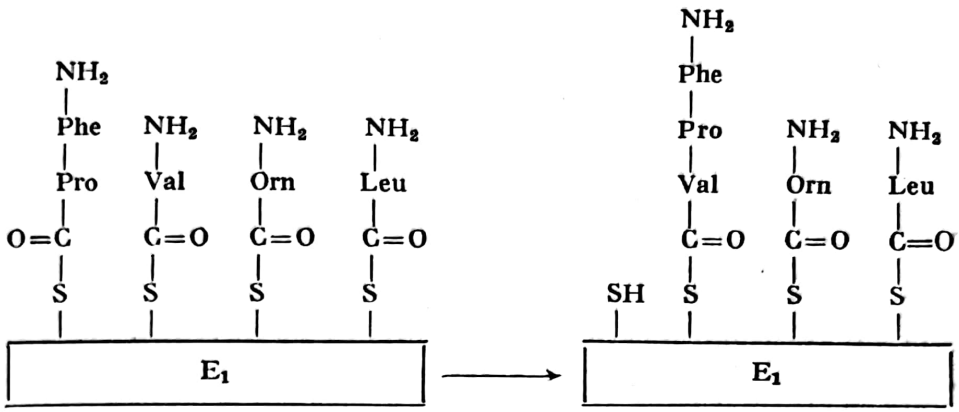
(2) $\text{aminoacil}-\text{AMP} + \text{E}-\text{SH} \rightarrow \text{E}-\text{S}\sim\overset{\overset{\text{O}}{\|}}{\text{C}}-\overset{\overset{\text{R}}{|}}{\text{CH}}-\text{NH}_3^+ + \text{AMP}$

L-prolina, L-valina, L-ornitina și L-leucina formează legături tioesterice cu grupe sulfhidril specifice din E_1 iar D-fenil-alanina formează o legătură tioesterică cu un grup —SH din E_2. Ulterior, se inițiază sinteza peptidei printr-o interreacție între E_1 și E_2 în sensul că radicalul D-fenilalaninei (unit cu E_2) se transferă la grupul imino al L-prolinei, unite cu E_1 și rezultă o dipeptidă activată:

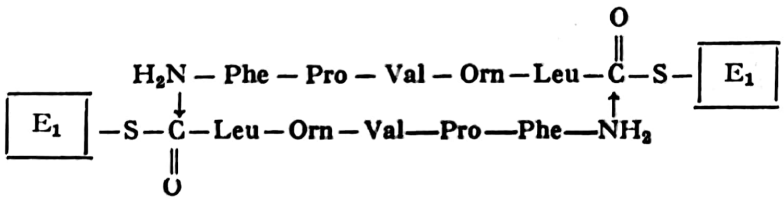
$$\text{E}_2-\text{S}\sim\overset{\overset{\text{O}}{\|}}{\text{C}}-\text{Phe}-\text{NH}_3^+ + \text{E}_1-\text{S}\sim\overset{\overset{\text{O}}{\|}}{\text{C}}-\text{Pro}-\overset{\overset{|}{}}{\text{NH}} \rightarrow \text{E}_2-\text{SH} + \text{E}_1\text{S}\sim\overset{\overset{\text{O}}{\|}}{\text{C}}-\text{Pro}-\text{Phe}-\text{NH}_3^+$$

Scanned with OKEN Scanner

Reacţiile următoare necesită numai enzima E_1. Grupul carbonil activat din radicalul prolinic al dipeptidei reacţionează cu grupul amino al radicalului valinei fixat la alt sulfhidril din aceeaşi enzimă şi rezultă tripeptida:



Procesul descris şi ilustrat se repetă cu oritina şi apoi cu leucina, rezultînd un pentapeptid unit de enzima E_1. În cele din urmă, pentapeptidele activate şi ataşate la două molecule diferite de E_1 reacţionează una cu alta formînd gramicidina S, ciclică.



Din urmărirea mecanismului acestei căi de biosinteză se desprind două observaţii demne de remarcat:

a) Secvenţa aminoacizilor din gramicidina S este determinată de aranjarea spaţială şi specificitatea enzimelor E_1 şi E_2. Pentru fiecare legătură peptidică formată trebuie să existe cel puţin o subunitate proteică în enzima respectivă (E_1). Prin urmare, acest mod de sinteză este mult mai puţin economic, în comparaţie cu mecanismul ribozomal. Probabil de aceea s-a constatat că el nu este utilizat decît pentru peptide cuprinzînd cel mult 15 resturi de aminoacizi.

b) Sinteza gramicidinei S se aseamănă foarte mult ca mecanism cu sinteza acizilor graşi deoarece în ambele procese sînt utilizaţi intermediari activaţi sub formă de tioesteri. Ceva mai mult, cercetările au dovedit că enzima E_1 cuprinde un rest de fosfopanteteină (ataşat covalent). Se presupune că tiolul fosfopanteteinei este probabil cărăuşul catenei peptidice în formare şi o deplasează de la o poziţie la alta în enzima E_1, avînd aceeaşi funcţie cu grupul tiol central din sistemul multienzimatic participant la biosinteza acizilor graşi.

Conform studiilor şi observaţiilor făcute de Fritz Lipmann, se poate considera că mecanismul de sinteză a polipeptidelor cu acţiune antibiotică, de felul gramicidinei S, este o reminiscenţă a unui mecanism primitiv de sinteză proteică, utilizată în primele trepte ale evoluţiei, pe cînd mecanismul de biosinteză proteică la nivel ribozomal corespunde unor trepte superioare ale evoluţiei.

Scanned with OKEN Scanner

5. PARTICULARITĂȚILE CROMOZOMILOR LA EUCARIOTE

Datorită faptului că procariotele și virusurile sînt mai simplu organizate, cunoștințele cu privire la caracterele lor genetice — și în special cele relative la modul de exprimare a informației genetice — sînt mult mai ample decît cunoștințele din același domeniu privind eucariotele. Cu toate acestea, rezultatele multiplelor cercetări efectuate asupra eucariotelor în ultima vreme, au relevat unele caractere care diferențiază net eucariotele de procariote și virusuri. Aceste diferențieri sînt menționate în cele ce urmează.

O celulă din organismul uman conține peste 1 000 ori mai multe molecule de ADN față de o celulă de Escherichia coli și de aproape 100 000 ori mai multe decît fagul λ. Pe de altă parte (așa cum s-a menționat în Capitolul VI), ADN-ul la organismele superioare este asociat cu proteine bazice numite histone, pe cînd la cele inferioare nu există o asemenea asociere.

Morfologia distinctivă a cromozomilor la eucariote — așa cum apare la microscopul optic — arată că aceștia au un grad de organizare structurală mult mai ridicat, față de genomii procariotelor. Mai mult decît atît, însăși forma cromozomilor din celulele eucariotelor se schimbă sensibil în cursul vieții celulei. O altă diferență remarcabilă este că la eucariote cromozomii sînt atașați la membrana nucleară. Această membrană — precum și o alta internă — nu se întîlnesc la procariote. În plus, celulele eucariotelor sînt mult diferențiate și creează cromozomilor o suprafață impresionantă pentru informare.

La eucariote un cromozom cuprinde o singură moleculă de ADN dublu helicoidală. Această moleculă este lineară, fără ramificații. De asemenea, ADN-ul din celulele eucariotelor, spre deosebire de ADN-ul procariotelor, conține numeroase secvențe de nucleotide cu același fel de bază. Deși au fost foarte bine studiate aceste secvențe repetitive, rolul lor nu este încă elucidat. Pe de altă parte, în ADN-ul eucariotelor și genele de formare a ARN-ului ribozomal se repetă una după alta, de cîteva sute de ori. Regiunile repetate care servesc pentru transcriere în ARN (m-ARN sau s-ARN) sînt separate de regiuni netranscriptibile. Acestea pot însuma nucleotidele corespunzătoare la cca. 800 perechi de baze.

Cromozomii din celulele somatice ale tuturor animalelor și plantelor cuprind mai multe tipuri de proteine mici cu caracter bazic din categoria histonelor (vezi capitolul VI). Din cromozomii eucariotelor s-au izolat prin cromatografie pe hîrtie cinci tipuri de histone. Este remarcabil faptul că într-unul din

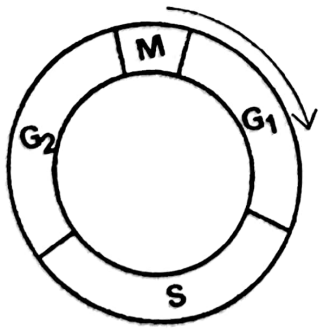


Fig. VII.5. Fazele vieții unei celule de eucariote:
M=mitoza; G_1=faza premergătoare sintezei de ADN; S=perioada de sinteză a ADN-ului; G_2=faza ulterioară a sintezei de ADN.

aceste tipuri de histone (histona IV) secvența aminoacizilor este aproape aceeași în toate organismele vegetale și animale. Aceste histone rămîn constante un timp foarte îndelungat, mai mult de un bilion de ani de evoluție. Datorită

Scanned with OKEN Scanner

caracterului lor constant, se consideră că aceste histone nu sînt implicate în controlul specific al expresiei genetice dar au un rol important în consolidarea („cimentarea") helixurilor duble din ADN. Numeroase cercetări recente au relevat că datorită histonelor moleculele de ADN devin mult mai compacte. Însă la eucariote acest aspect variază în cursul vieţii celulare. Într-adevăr, ADN-ul din cromozomii eucariotelor are aspectul cel mai compact în cursul metafazei; în interfază o parte din cromozomi se dispersează iar cimentarea prin histone slăbeşte. În fig. VII. 5 se poate urmări ciclul vieţii unei celule din organismul eucariotelor. Din figură rezultă că diversele faze se succed într-o ordine bine determinată. Lungimea acestor faze depinde de tipul de celulă şi de condiţiile de creştere însă — totdeauna — mitoza reprezintă cea mai scurtă fază.

Cromozomii eucariotelor sînt asociaţi cu proteine de natură nehistonică. Aceste proteine, care nu sînt histone, se consideră că iau parte activă la controlul specific al funcţiei genetice. Ele se deosebesc de histone din mai multe puncte de vedere: majoritatea au caracter acid (nu bazic ca cel al histonelor); sînt foarte heterogene şi variabile de la o categorie de celule la alta, în aceeaşi specie; pot stimula transcripţia în sistemele acelulare.

La eucariote ADN-ul suferă o replicare semiconservativă, ca şi la procariote, însă, aşa cum rezultă din studiile de microscopie electronică, ADN-ul eucariotelor are o replicare bidirecţională, cu mai multe origini. Aceste origini multiple de iniţiere a replicării explică, în mare măsură, formarea rapidă a helixurilor foarte lungi de ADN la eucariote. De fapt, cercetările au arătat că replicarea unei molecule de ADN într-un timp mai scurt de 3 minute este rezultatul acţiunii cooperative a mai mult de 6 000 iniţieri. În sfîrşit, o ultimă caracteristică biologică celulară a eucariotelor o constituie faptul că m-ARN-ul citoplasmatic provine din precursori mai mari aflaţi în nucleu. Într-adevăr, nucleul celular la eucariote conţine molecule foarte mari de ARN care trăiesc numai cîteva minute (spre deosebire de m-ARN citoplasmatic). ARN din nuclei au greutăţi moleculare de cca 2×10^7 (mai mari cu un ordin de mărime faţă de m—ARN citoplasmatici) şi sînt localizaţi în porţiunea extranucleolară. Majoritatea lor au la capătul 3′ o coadă lungă de nucleotide cu adenină (poli A) şi li se adaugă treptat aproximativ 150—200 resturi de acelaşi fel, după ce a avut loc transcripţia completă. Regiunea cuprinzînd coada cu poli A la capătul 3′ se găseşte şi în m-ARN citoplasmatic, ceea ce dovedeşte că acesta a rezultat din scindarea unei anumite părţi a ARN-ului din nucleu. Capătul 5′ al acestuia din urmă şi unele secvenţe consecutive de nucleotide nu trec în citoplasmă, necontribuind astfel la formare de m-ARN.

6. INTERFERONUL

6.1. DEFINIŢIE

Interferonul a fost descoperit de Isaacs şi Lindenmann în 1957. De atunci şi pînă în prezent s-au efectuat studii numeroase şi foarte interesante care au contribuit în mare măsură la conturarea naturii şi funcţiei interferonului, permiţînd totodată să se întrevadă şi eventuala sa utilizare în biologie.

Interferonul este o proteină produsă de către celulele invadate de un virus infectant şi care acţionează în aşa mod încît previne replicarea viru-

Scanned with OKEN Scanner

sului. Interferonul poate fi produs atît de celulele din culturi de țesuturi cît și de cele din animalele vii. Este de remarcat că nu toate tipurile de celule pot produce interferon; cele care-l produc în special, sînt limfocitele, celulele din sistemul reticuloendotelial și din circulația sanguină. S-a constatat însă că în organismele animale, celelalte celule au capacitatea de a-și însuși interferonul produs de celulele sanguine, fapt care asigură protecția locală împotriva infecției virale.

6.2. PROPRIETĂȚILE INTERFERONULUI

Pentru studiul proprietăților interferonului s-au făcut numeroase încercări de purificare a materialelor celulare care-l cuprindeau și de izolare a lui în stare pură. Cu toate eforturile depuse în aceste direcții pînă în prezent nu s-a reușit să se obțină un interferon perfect pur. S-a reușit însă, ca la preparatele care-l procurau în stare aproape pură, să se cerceteze proprietățile lui fizico-chimice și să i se evidențieze însușirile biologice. S-a constatat astfel că interferonul prezintă specificitate de specie, în ceea ce privește organismul animal dar este complet lipsit de specificitate față de virusuri; dimpotrivă, interferonul are un spectru larg de acțiune antivirală. Interferonul este nedializabil, nesedimentabil la 105 000 g timp de 2 ore, este hidrolizat de enzimele proteolitice, posedă punct izoelectric între pH 6,5 și 7,5 și este stabil în mediu acid (la $pH \simeq 2$). Grupările funcționale constitutive, esențiale pentru păstrarea activității biologice față de virusuri, sînt: amino, disulfurică și gruparea γ-S-metil din metionină.

6.3. INDUCTORII

Entitatea responsabilă pentru formarea interferonului se numește inductor. Această entitate este reprezentată atît de ADN-ul cît și de ARN-ul viral. Primul inductor, folosit de Isaacs și Lindenmann în experiențele lor, a fost obținut din virusul gripei inactivat prin căldură. Apoi s-au mai obținut și alți inductori din virusuri inactivate prin iradiere cu lumină ultravioletă. În toate aceste cazuri, inductorii au fost ADN sau ARN bicatenar izolat din virusul respectiv. S-a descoperit însă că rolul de inductor pentru formarea unui interferon îl poate juca și un copolimer al anhidridei maleice cu eterul divinilic. Datorită naturii componenților și proprietăților lui, acestui produs de copolimerizare i s-a dat numele de inductor plastic, fiind recunoscut ca unul din cei mai efectivi inductori de formare a interferonului. Cu toate acestea, inductorii naturali efectivi pentru formarea interferonului rămîn tot ADN-ul și ARN-ul bicatenar viral. Existența a două catene nucleotidice se pare că este esențială, deoarece s-a demonstrat că ARN-ul viral monocatenar nu este efectiv. Pe de altă parte, formarea interferonului nu este indusă cu aceeași intensitate de către cele două feluri de acizi nucleici bicatenari: este mai pronunțată sub acțiunea ARN-ului bicatenar și mai redusă sub acțiunea ADN-ului. De fapt, ADN-ul este efectiv numai în anumite condiții, iar hibrizii constituiți dintr-o catenă de ADN și una de ARN sînt total inefectivi. Variația capacității inductoare de la un fel de acid nucleic bicatenar la altul depinde, în mare măsură, de structura inițială a catenelor; în special, ea depinde de posibilitatea acestei structuri de a îmbrăca mai multe stări conformaționale. Într-adevăr, cu cît molecula bicatenară are capacitatea de a trece

Scanned with OKEN Scanner

prin mai multe conformaţii, cu atît se creează mai multe situaţii favorabile de recunoaştere şi interacţiune cu anumite molecule, situaţii strict necesare în procesul inducerii (vezi mecanismul, mai departe). Scăderea acestei capacităţi se realizează uşor prin substituirea cu H a grupărilor OH din poziţia 2' în poliribonucleotide; ceea ce explică faptul, semnalat mai înainte, că ADN-ul bicatenar este mai puţin efectiv decît ARN-ul.

O descoperire relativ recentă a permis cuprinderea în categoria inductorilor de interferon a unei substanţe cu greutate moleculară mică, deosebită complet ca structură de inductorii polinucleotidici. Acesta este tiloronul, cu compoziţia: 2,7-bis-2-(dietilamino) fluoren-9-onă. S-a constatat că administrarea orală sau parenterală la şoareci a acestei substanţe induce formarea interferonului în celulele sanguine circulante, asigurînd astfel protejarea animalului împotriva mai multor infecţii virale. Mecanismul de producere a interferonului sub acţiunea tiloronului nu este încă elucidat însă din diverse studii toxicologice s-a tras concluzia că în urma administrării de tiloron se produc modificări în sistemele hematopoietic şi reticuloendotelial la multe animale. Pe de altă parte, unele cercetări au arătat că tiloronul nu produce interferon în culturile de celule aflate în stare de dezvoltare, ceea ce dovedeşte că şi tiloronul, ca şi endotoxina, nu poate determina sinteza *de novo* a interferonului dar poate provoca descompunerea interferonului preformat. Faptul că tiloronul nu este în măsură să producă interferon la alte animale, în afară de rozătoare, face ca el să nu poată fi aplicat în terapia umană.

6.4. REGLAREA GENETICĂ A FORMĂRII INTERFERONULUI

Interferonul ia naştere în celule în urma derepresiei genei care codifică sinteza proteinei respective. În fig. VII.6 se prezintă schematic modul de reglare genetică a formării interferonului.

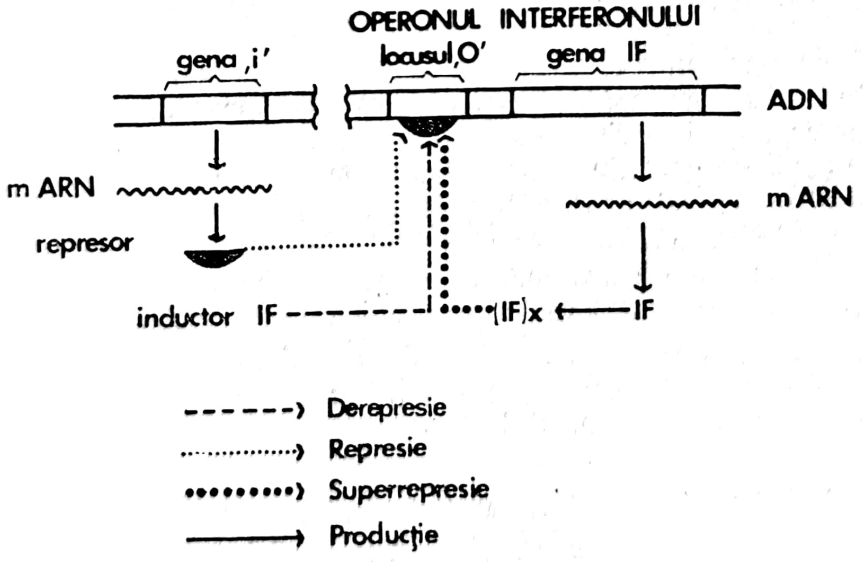


Fig. VII.6. Reglarea genetică a sintezei interferonului.

După cum se observă, schema prezentată este foarte asemănătoare cu modelul dat de Jacob şi Monod pentru reglarea genetică a sintezei proteinelor la bacterii. Din figură rezultă că gena care codifică sinteza interferonului

Scanned with OKEN Scanner

este IF iar proteina represor este codificată de gena *i*. Represorul se poate combina cu locusul operator (0). În acest stadiu, gena IF este represată. Activarea sa se face în urma acţiunii inductorului (efector) care se combină cu represorul. Transcripţia genei IF are ca rezultat sinteza unui ARN mesager, m-ARN, care participă la biosinteza interferonului (IF). Moleculele de interferon rezultate se pot asocia în oligomeri $(IF)_x$, în care x = multiplu de monomeri. Este de remarcat că adesea multiplicarea are ca rezultat modificarea configuraţiei sau a formei moleculelor de monomer. Această modificare face ca interferonul să se poată combina cu represorul său în locusul operator 0. Complexul rezultat astfel din oligomer şi represor acţionează ca un superrepresor, exercitînd o represie mai intensă şi mai de durată decît cea realizată prin acţiunea represorului singur.

Stimularea sintezei interferonului este realizată de virusuri şi ARN bicatenar, prin derepresie. De asemenea, unii inhibitori metabolici recunoscuţi (cicloheximida, actinomicina D) exercită o acţiune de inducţie remarcabilă în sinteza interferonului. Este interesant faptul că intervenţia lor nu este de simpli inductori, ci ei exercită acest efect într-un mod indirect. Spre exemplu, actinomicina D blochează formarea ARN-ului mesager participant la sinteza represorului genetic, fără a interveni în formarea ARN-ului mesager care codifică sinteza interferonului. Ca urmare, proteina-represoare nu se sintetizează dar se sintetizează proteina-interferon. Acest gen de inducţie exercitat de inhibitorii metabolici se numeşte superinducţie.

6.5. MECANISMUL DE ACŢIUNE AL INTERFERONULUI

Unele studii efectuate pe sisteme celulare invadate de diverse virusuri, în prezenţa sau absenţa interferonului, au arătat că acesta opreşte sinteza ambelor tipuri de acizi nucleici virali, ADN şi ARN. Pe de altă parte, s-a constatat că în prezenţa interferonului ribozomii din celule fixează ARN-ul viral dar nu permit traducerea acestuia. Dacă se introduce însă tripsină în sistemul celular cuprinzînd interferon şi virus, capacitatea ribozomilor de a permite traducerea m-ARN-ului viral este recîştigată. Acest fapt conduce la presupunerea că sub acţiunea interferonului, ribozomii îşi modifică parţial configuraţia (ceea ce permite fixarea dar nu şi deplasarea m-ARN-ului viral), iar în prezenţa enzimei proteolitice (tripsina), configuraţia se restabileşte. Cele mai noi date cu privire la acţiunea interferonului tind să arate că intervenţia acestuia se manifestă încă de la replicarea iniţială care conduce la formarea m-ARN-ului viral şi anume prin blocarea sintezei de ARN-polimerază.

Din cele menţionate aici, rezultă că mecanismul intim de acţiune antivirală a interferonului se datoreşte atît intervenţiei lui la nivelul biosintezei cît şi al transcrierii m-ARN-ului viral.

6.6. POSIBILITĂŢI ŞI PERSPECTIVE DE UTILIZARE A INTERFERONULUI

Numeroase cercetări efectuate, în special în ultimii 9 ani, au dus la concluzia că administrarea directă a unui interferon sau injectarea unui inductor pentru producerea de interferon endogen, au ca rezultat prevenirea şi chiar tratarea infecţiilor virale. Utilizarea directă a interferonului prezintă

Scanned with OKEN Scanner

totuşi dezavantajul că necesită cantităţi relativ mari de proteină pură cu activitate antivirală netă şi nu este îndeajuns de eficientă din punct de vedere terapeutic din cauză că proteina injectată are o durată de viaţă foarte scurtă în sîngele circulant, după injectare. De aceea, administrarea de inductori ai interferonului este mai convenabilă; cu atît mai mult cu cît în acest caz şi durata activităţii antivirale este mai lungă.

Calea cea mai comodă de administrare a inductorului şi care a dus — pînă în prezent — la rezultate foarte bune, este cea intranazală. Într-adevăr, deoarece majoritatea virusurilor folosesc această cale de intrare în organismele pe care le invadează este necesar ca ea să fie protejată prin administrarea preventivă de inductor sau de însuşi interferon. Pe de altă parte, în afară de faptul că este cea mai eficientă, calea intranazală este şi cea mai lipsită de riscurile administrării parenterale.

Unele cercetări efectuate pe şoarece au arătat că după administrare intranazală, interferonul se găseşte în celulele întregului tract respirator; în special, în trahee şi plămîni. Se asigură astfel o intensă terapie, la şoarece, împotriva virusului gripei şi al pneumoniei. Rezultate asemănătoare s-au obţinut şi în experienţe — de acelaşi gen — efectuate la iepuri. Cînd s-a aplicat aceeaşi administrare la om, rezultatele au fost mai puţin nete şi efectele mai reduse. Cu toate acestea, ele nu s-au dovedit descurajatoare; dimpotrivă, aşa cum rezultă din studii recente, se caută să se găsească substanţe diverse ca inductori în sinteza de interferon şi se controlează eficienţa lor faţă de numeroase infecţii ale organismului uman. Pînă în prezent, se consideră că inductorii pot fi utilizaţi cu succes în scop profilactic la om, prin instilaţii nazale sau oculare. Utilizarea este deocamdată limitată din cauza toxicităţii unor inductori şi a efectelor secundare observate adesea.

Trebuie subliniat însă faptul că semnificaţia clinică a cercetărilor în domeniul interferonului nu rezidă numai în utilizarea lui ca substanţă antivirală ci, aşa cum rezultă din unele studii recente, interferonul şi inductorii săi sînt totodată substanţe care se opun infecţiilor cu protozoare şi chiar afecţiunilor neoplazice.

Scanned with OKEN Scanner

Capitolul VIII

MOBILIZAREA ŞI TRANSFERUL DE ENERGIE ÎN ORGANISMELE VII

Materia vie prezintă o organizare structurală complexă. Moleculele mici de aminoacizi, nucleotide, monozaharide, acizi graşi prin policondensare formează macromoleculele proteice, acizi nucleici, polizaharide, lipide complexe. Pe o treaptă superioară de organizare acestea se asamblează în agregate supramoleculare şi mai departe în organite subcelulare, celule, ţesuturi. Realizarea unor structuri complexe, cu un grad înalt de organizare spaţială şi păstrarea lor nealterată în cursul vieţii organismului se opune sensului de desfăşurare spontană a proceselor din natură care duce spre dezorganizare, spre haos. Întreaga biosferă desfăşoară o luptă neîncetată pentru menţinerea structurii proprii şi a funcţiilor inerente acestora. Pentru a exista şi a supravieţui, organismele vii se află într-un schimb permanent de energie cu mediul înconjurător. Energia solară este utilizată direct numai de către plante şi cîteva specii de micoorganisme. Animalele iau din mediul ambiant molecule organice complexe, în ultimă instanţă rodul activităţii fotosintetice a plantelor, a căror energie chimică potenţială o mobilizează prin degradare la substanţe mai simple. Energia chimică a substanţelor nutritive, după transformarea ei într-o formă convenabilă, este utilizată pentru efectuarea de travalii specifice vieţii — creştere, reparaţii tisulare, activitate contractilă activitate osmotică. Organismele vii posedă dispozitive de transformare a energiei de o înaltă fineţe şi eficacitate.

Pentru a înţelege modul în care se efectuează schimburile de energie între organismele vii şi mediul înconjurător, cum are loc transferul de energie între diverse procese metabolice, este necesară prezentarea legilor fundamentale care guvernează procesele însoţite de schimburi energetice. Organismele vii funcţionează în conformitate cu aceleaşi legi care guvernează şi lumea nevie. Disciplina care studiază transformările şi utilizarea energiei în lumea vie este termodinamica biochimică sau bioenergetica.

1. NOŢIUNI DE BIOENERGETICĂ

Termodinamica studiază efectele energetice ce însoţesc diversele fenomene şi procese din natură. Este una din ştiinţele cu cele mai largi aplicaţii, deoarece orice eveniment natural sau provocat de om, implică modificarea conţinutului în energie al sistemelor şi schimburi de energie între aceste sisteme.

Scanned with OKEN Scanner

Obiectul de studiu al termodinamicii îl constituie aşa-zisele sisteme termodinamice care nu sînt altceva decît porţiuni din univers separate real sau imaginar de rest. Ceea ce nu face parte din sistemul considerat, restul universului, constituie mediul înconjurător. Între un sistem termodinamic şi mediul înconjurător au loc schimburi de energie. Ceea ce se ia drept mediul înconjurător al unui sistem dat este acea porţiune din univers care este afectată de schimbul energetic cu sistemul. De pildă, se încălzeşte cînd sistemul cedează căldură sau se răceşte dacă sistemul absoarbe căldură. Lumea vie poate fi analizată termodinamic la diverse niveluri. Întreaga biosferă poate fi opusă universului neînsufleţit sau indivizii unei specii sau celulele izolate pot fi cercetate ca sisteme termodinamice în schimb de energie cu mediul înconjurător. În sfîrşit, reacţiile biochimice individuale pot fi ele singure obiectul unui studiu termodinamic.

În termodinamica clasică sistemele cuprind o cantitate bine determinată de materie, de substanţă şi ele nu pierd şi nici nu cîştigă substanţă în cursul transformărilor pe care le suferă. Astfel de sisteme sînt sisteme *închise*. Sistemele termodinamice zise *deschise* schimbă cu mediul înconjurător atît substanţă cît şi energie. Obiectul termodinamicii clasice sînt sistemele închise. Organismele vii sînt sisteme deschise, ele sînt traversate de un flux de energie şi de materie. Legile fundamentale ale termodinamicii, stabilite pentru sistemele închise, au aplicaţii largi la cercetarea schimburilor de energie ce însoţesc diversele reacţii metabolice. Analiza termodinamică a organismelor vii ca sisteme deschise este dificilă la un nivel elementar datorită instrumentului matematic complicat cu care operează această disciplină. În cele ce urmează se studiază numai legile termodinamicii clasice care are drept obiect sistemele închise.

Termodinamica nu urmăreşte desfăşurarea proceselor în timp. Ea analizează modificarea conţinutului total în energie al unui sistem cînd acesta trece dintr-o stare (starea iniţială) în alta (starea finală) şi schimbul de energie dintre sistem şi mediu, corelativ acestor transformări. Analiza termodinamică a unei reacţii nu dă indicaţii cu privire la mecanismul şi viteza cu care sistemul a trecut din starea iniţială în cea finală. Timpul şi viteza nu apar în relaţiile termodinamice. Cinetica chimică este ştiinţa care operează cu aceste mărimi.

Legile termodinamicii sînt deduse din două principii fundamentale. Acestea statuează adevăruri bazate pe nenumărate observaţii ale fenomenelor naturale, ele nu sînt derivate din alte legi. Caracterul lor de adevăr rezidă în aceea că ele nu au putut fi niciodată contrazise şi explică satisfăcător toate comportările sistemelor.

Principiul I, principiul conservării energiei, afirmă că energia universului este constantă. Energia nu poate fi creată şi nici distrusă. Este posibilă doar transformarea energiei dintr-o formă în alta. Transformările diverselor specii de energie au loc în cantităţi echivalente, energia nu se pierde.

Principiul II, este principiul evoluţiei, el stabileşte posibilitatea şi sensul în care au loc transformările însoţite de schimburi de energie. Experienţa de fiecare zi ne arată că procesele întovărăşite de transfer de energie se desfăşoară de la sine numai într-o direcţie şi numai pînă la o anumită limită. De exemplu, sînt procese spontane ce au loc fără intervenţia vreunui factor extern: căderea unui corp sub acţiunea forţei gravitaţionale, curgerea electro-

Scanned with OKEN Scanner

nilor în lungul unui gradient de potenţial, revenirea în poziţia de repaus a unui arc întins, difuziunea unui gaz în tot volumul ce îi stă la dispoziţie. Care este factorul care determină spontaneitatea unei transformări, de ce la o anumită limită procesul încetează?

Analiza a nenumărate fenomene naturale sau provocate experimental a dus la definirea unei funcţii termodinamice cu ajutorul căreia putem prevedea sensul şi limita desfăşurării libere a unui proces, această funcţie este entropia (S), definită ca gradul de dezordine a unui sistem. Reprezintă mişcarea dezordonată, haotică a particulelor, a moleculelor, a atomilor care alcătuiesc un sistem. Cu cît libertatea de mişcare a acestor particule este mai mare, au o distribuţie mai dezordonată, cu atît entropia sistemului este mai mare. La o temperatură dată entropia unui gaz este mai mare decît a unui lichid. Un gaz la temperaturi diferite, are entropii diferite, mai mare la temperatură ridicată deoarece moleculele deplasîndu-se mai rapid se distribuie mai haotic în volumul ce îl au la dispoziţie. Un solid are entropia mai mică deoarece în cristal atomii sau moleculele ocupă poziţii relativ fixe, mişcarea lor fiind îngrădită de rigiditatea reţelei cristaline. Combinaţiile cuprinzînd mai puţine covalente au, în general entropii mai mari decît acelea în care legăturile sînt mai numeroase şi mişcarea atomilor este îngrădită într-o mai mare măsură. Moleculele organice complexe, proteinele, acizii nucleici, sînt compuşi cu entropii mici. De asemenea, celulele vii şi organismele pluricelulare cu organizarea lor structurală complexă, sînt sisteme naturale cu entropiile cele mai mici.

Principiul al II-lea statuează că entropia universului creşte. Transformările care au loc în mod liber sînt însoţite de o creştere a entropiei ansamblului constituit din sistem plus mediul înconjurător. Procesele spontane decurg cu o creştere a entropiei, a gradului de dezordine, deoarece aranjarea haotică, întîmplătoare, a particulelor este o stare mult mai probabilă decît o aranjare ordonată. Ordinea se poate transforma spontan în dezordine. În schimb procesul invers, diminuarea dezordinei, nu poate să aibă loc decît dacă sistemul absoarbe din mediu energie, de fapt haotizează, diminuează entropia mediului înconjurător.

Procesele examinate mai înainte ca procese spontane au loc în mod evident cu creşterea entropiei. În alte cazuri, pentru a discerne sensul în care variază entropia este necesară o analiză profundă a sistemelor.

Entropia elementelor şi a combinaţiilor simple se poate măsura, ea se exprimă în unităţi entropice cu dimensiuni de calorii per grad per mol. Pentru substanţele complexe, mai ales pentru moleculele care intră în constituţia organismelor vii, calculul entropiilor pune probleme care nu au fost deocamdată depăşite.

Din cauza celor spuse mai înainte modificările entropice fiind greu de evaluat în foarte multe cazuri, s-a căutat definirea unei alte funcţii termodinamice, legată însă de entropie care să servească drept criteriu de desfăşurare liberă a proceselor. Această funcţie este energia liberă.

1.1. ENERGIA LIBERĂ

Conţinutul în energie al unui sistem, de exemplu al unei substanţe chimice, este determinat de nenumăraţi factori, energia cuprinsă în nucleu, energia electronilor, vibraţiile electronilor de legătură, energia de rotaţie şi de transla-

Scanned with OKEN Scanner

ție a moleculelor. Totalitatea acestor factori determină energia internă a sistemului (E). Această cantitate de energie nu poate fi măsurată sau calculată nici pentru cele mai simple substanțe chimice. De fapt, termodinamica nu operează cu valori absolute ale energiilor interne ale sistemelor ci numai cu modificările lor în cursul unor transformări pe care le suferă sistemul. Conținutul în energie al unui sistem se poate modifica atît prin variația energiei sale, cît și ca urmare a unor schimbări energetice cu mediul înconjurător. De pildă, sistemul poate pierde energie efectuînd un travaliu asupra mediului (cum ar fi un travaliu de expansiune, de mărire a volumului); un sistem, din contră, își crește conținutul în energie dacă mediul efectuează un travaliu asupra sistemului (o compresiune).

Ținîndu-se seama că reacțiile biochimice au loc în soluții apoase în care variațiile de volum, de presiune și de temperatură sînt neglijabile în cursul transformărilor, în termodinamica biochimică pot fi făcute anumite simplificări în ceea ce privește modul de evaluare a schimburilor energetice și în prevederea sensului în care transformările pot decurge liber, spontan.

În reacțiile chimice care au loc la volum, temperatură și presiune constantă, modificările conținutului energetic al sistemelor sînt datorate exclusiv unor transformări intrinseci a sistemului; formare sau desfacere de covalențe, transfer de electroni, schimb de protoni, interacțiuni hidrofobe, formare de asociații intermoleculare și altele. Dacă sistemul a avut în starea sa inițială energia internă E_1 și în stare finală energia E_2, diferența $E_2 - E_1 = \Delta E$ măsoară variația energiei interne a sistemului, respectiv, în condițiile restrînse amintite, măsoară tocmai modificarea energetică totală ce însoțește acest proces. O valoare ΔE negativă arată că sistemul are o energie internă mai mică în starea finală; din contră cînd ΔE are valoare pozitivă, în cursul transformării sistemul a captat energie din mediu conținutul său energetic este mai ridicat cu valoarea ΔE.

Ignorîndu-se genurile de interacțiuni care determină conținutul în energie internă al unei substanțe, al unui sistem, putem lua în considerație doi factori. O fracțiune din energia internă a sistemului este rezultatul mișcării dezordonate a particulelor componente, atomi sau molecule, depinde deci de valoarea entropiei sale și este dată de produsul dintre entropie și temperatura absolută (TS). Componenta energetică dată de TS reprezintă o energie care nu mai poate fi transformată în travaliu, în lucru util (la temperatură constantă). Un travaliu înseamnă o mișcare ordonată, vectorizată. Ori, dezordinea nu se poate transforma, la o aceeași temperatură, în ordine. Factorul TS este o energie de calitate inferioară, o energie degradată a sistemului. Din contră, cealaltă componentă a energiei sistemului este convertibilă (la temperatură constantă) în lucru util și poartă denumirea de *energie liberă* (G), în opoziție cu fracțiunea TS căreia i se mai spune *energie legată*. Putem afirma că energia liberă a unui sistem este reprezentată de ceea ce este ordine în sistem și poate deveni dezordine, de ceea ce nu este deja haotizat.

În rezumat, energia internă a unui sistem este suma a două componente, energie liberă (G) și conținut entropic (TS):

$$E = G + TS$$

De aici rezultă că într-o reacție variația energiei interne a sistemului (ΔE) este determinată de variațiile energiei sale libere (ΔG) și de variațiile entropiei (ΔS):

$$\Delta E = \Delta G + T\Delta S$$

Scanned with OKEN Scanner

Principiul al doilea postulează că reacţiile au loc spontan cînd entropia sistemului în starea finală este mai mare, ΔS are valoare pozitivă, respectiv energia sa liberă scade. Orice reacţie chimică, orice proces are loc în sensul în care energia liberă a sistemului diminuează capacitatea sa de a efectua travalii (la temperatură constantă). Forţa motoare a reacţiilor chimice este tendinţa sistemului, pe de o parte, de a-şi mări gradul de dezordine şi pe de altă parte, de a-şi reduce conţinutul în energie liberă, energie ordonată.

În procesele spontane ΔE poate avea valori egale, mai mici sau mai mari decît zero. Cînd ΔE este nul sistemul nu a absorbit şi nici nu a cedat energie mediului cînd a trecut din starea iniţială în starea finală, ceea ce înseamnă că variaţia energiei libere, ΔG, a fost egală şi de semn opus cu termenul $T\Delta S$. În această situaţie o parte a energiei libere a sistemului s-a degradat, a devenit dezordine, entropie, într-o asemenea măsură încît creşterea entropiei multiplicată cu T, este egală cu scăderea energiei libere:

$$\Delta G = -T\Delta S$$

$$\Delta E = 0$$

Retractarea unei benzi de cauciuc întinsă este un proces spontan ce decurge fără modificarea conţinutului în energie internă a benzii. Forţa motoare care declanşează retractarea benzii este factorul entropic. În starea întinsă moleculele au o dispoziţie ordonată pe cînd în banda retractată libertatea lor de mişcare este mult mai mare. În foarte multe reacţii spontane energiile libere ale sistemelor diminuează, are loc o cedare de energie către mediu. În aceste transformări energiile libere variază puternic. O parte din energia liberă devine entropie iar cealaltă este cedată mediului înconjurător şi este recuperată sub formă de căldură (reacţii exoterme). De exemplu, oxidarea glucozei la bioxid de carbon şi apă (în condiţii standard) are loc cu scăderea energiei interne a sistemului cu —673 Kcal. Scăderea energiei libere este însă mai mare, este de —686 Kcal. Creşterea entropiei a avut loc pe seama a 0,043 Kcal din energia liberă a sistemului:

$$C_6H_{12}O_6 + 6\ O_2 = 6\ CO_2 + 6\ H_2O$$

$$\Delta E = \Delta G + T\Delta S$$

$$\Delta E = -673 \text{ Kcal}$$

$$\Delta G = -686 \text{ Kcal}$$

$$T = 298°K\ (25°C)$$

$$\Delta S = 0{,}043 \text{ Kcal}$$

Există procese spontane ce decurg prin captare de energie din mediu, astfel că energia internă a sistemului la sfîrşitul transformării este mai mare decît în starea iniţială. Respectiv procesul decurge endoterm, căldura de reacţie are o valoare pozitivă, mediul înconjurător se răceşte. În aceste reacţii spontane $\Delta G < 0$ şi $\Delta S > 0$, însă creşterea entropiei este mai mare şi sistemul nu îşi poate modifica energia liberă într-atît încît să compenseze variaţia pozitivă a termenului $T\Delta S$. Tot ceea ce a fost ordine în sistem s-a convertit în dezordine şi în plus sistemul mai absoarbe căldură din mediu care se adaugă mişcării dezordonate a stării finale. Procese spontane endoterme tipice sînt schimbările stării de agregare, evaporarea, topirea. Apa lichidă la 0° şi gheaţa

Scanned with OKEN Scanner

la 0° au entropii diferite. Apa lichidă are entropie mai mare şi topirea decurge spontan, dar întrucît gheaţa nu are suficientă energie liberă convertibilă în entropie la 0°, sistemul împrumută căldură din mediu.

În concluzie, evoluţia spontană a unei reacţii este determinată de tendinţa sistemelor de a-şi mări entropia, prin rearanjarea lor într-o formă cît mai dezordonată şi de tendinţa lor de diminuare a energiei libere, a capacităţii lor de a efectua travalii. Reacţiile biochimice au efecte entropice ridicate datorită complexităţii moleculelor care participă la aceste reacţii şi tendinţelor de complexificare prin creştere şi dezvoltare, caracteristice fiinţelor vii. Modificările entropice în reacţiile la care participă moleculele complexe sînt foarte greu de evaluat. În schimb, variaţiile energiilor libere sînt utilizate în mod curent drept criteriu de desfăşurare spontană a reacţiilor deoarece aceste variaţii sînt uşor de apreciat prin măsurarea cantităţilor de substanţă şi a concentraţiilor lor.

1.2. ENERGIA LIBERĂ DE REACŢIE

Energia liberă a unui compus chimic depinde de cantitatea de substanţă, este o mărime extensivă. Energia liberă a două molecule gram de substanţă (2 moli), este de două ori mai mare decît a unui singur mol. De asemenea, energia liberă este o mărime aditivă, energia liberă a unui sistem constituit din mai multe substanţe este egală cu suma energiilor libere a fiecăreia dintre ele. Un sistem constituit din substanţele A, B şi C fiecare cu energia liberă G_A, G_B şi G_C are energia liberă G:

$$G = G_A + G_B + G_C$$

Să considerăm că are loc reacţia:

$$A + B + C \rightarrow M + N + O$$

Sistemul reactanţilor constituie starea iniţială a unui sistem termodinamic iar sistemul rezultanţilor este starea sa finală. Dacă:

$$G_A + G_B + G_C = G_{\text{reactanţi}}$$

şi

$$G_M + G_N + G_O = G_{\text{rezultanţi}}$$

diferenţa

$$G_{\text{rezultanţi}} - G_{\text{reactanţi}} = \Delta G$$

arată variaţia energiei libere în reacţia considerată şi poartă denumirea de energie liberă de reacţie. Această energie liberă se exprimă sub formă de calorii sau kilocalorii şi reprezintă cantitatea maximă de lucru pe care îl poate efectua reacţia în condiţii bine determinate (izoterme).

Energiile libere de reacţie depind de cantităţile de substanţe care reacţionează. O aceeaşi reacţie poate avea ΔG diferite după cum sistemul reacţional cuprinde mai multă sau mai puţină substanţă. Pentru a se putea compara diversele reacţii în ceea ce priveşte efectele lor energetice trebuie ca aceste reacţii să se petreacă în aceleaşi condiţii, să privească transformarea unor cantităţi echivalente de substanţe. Pentru aceasta în termodinamică se defineşte o stare standard a substanţelor şi o temperatură standard. Temperatura standard este de 25°C (298°K). Pentru reacţiile care au loc în soluţie, aşa cum

Scanned with OKEN Scanner

este cazul reacţiilor biochimice, concentraţiile molare (1 M) reprezintă starea standard a substanţelor. Concentraţia apei în aceste condiţii este considerată în mod arbitrar egală cu unitatea. *Variaţia energiei libere într-o reacţie în care un mol de reactant s-a transformat într-un mol de rezultant — fiecare în stare standard — poartă denumirea de energie liberă de reacţie standard şi se notează cu* $\Delta G°$. Potrivit acestei definiţii, concentraţia oricărui component al sistemului trebuie menţinută la valoarea 1. Aceasta ar însemna că pentru soluţiile apoase pH-ul să fie considerat zero (căruia îi corespunde o concentraţie a H^+ de 1). Pentru reacţiile biochimice acest pH este departe de realitate şi de aceea în biochimie se defineşte o energie liberă de reacţie standard particulară, notată cu $\Delta G°'$, în care concentraţiile componentelor sînt păstrate la valoarea de 1 molară, cu excepţia concentraţiei ionilor de hidrogen care are o valoare de 10^{-7} ioni gram/litru (pH=7).

Reacţiile pentru care $\Delta G°'<0$ sînt reacţii care în condiţii standard au loc spontan de la stînga la dreapta; astfel de reacţii sînt denumite reacţii exergonice, ele sînt însoţite de furnizare de energie liberă mediului. Din contră reacţiile pentru care $\Delta G°'>0$, nu pot avea loc liber în sensul de la stînga la dreapta în condiţiuni standard; ele sînt reacţii endergonice. Pentru a transforma compuşii care se află în partea stîngă a ecuaţiei chimice în rezultanţi este nevoie ca sistemul să fie alimentat cu energie liberă din afară. Reacţiile endergonice într-un sens sînt însă exergonice în sensul opus, de la dreapta la stînga.

Energiile libere de reacţie standard sînt constante fizice ce caracterizează tendinţa de evoluţie a unui sistem reacţional în condiţii bine determinate. La alte concentraţii decît cele standard sistemul va avea alte tendinţe de desfăşurare spontană, eventual reacţia în sensul direct poate deveni improbabilă. O creştere a concentraţiei reactanţilor măreşte valoarea negativă

Tabelul VIII.1

Valorile $\Delta G°'$ ale cîtorva tipuri de reacţii biochimice

Reacţia	$\Delta G°'$ (Kcal/mol) pH=7; 25°
Oxidare	
glucoză + O_2 → 6 CO_2 + 6 H_2O	−686,0
acid palmitic + 23 O_2 → 16 CO_2 + 16 H_2O	−2 338,0
Hidroliză	
zaharoză + H_2O → glucoză + fructoză	−5,5
ATP + H_2O → ADP + P_i	−7,3
glucoză-6-P + H_2O → glucoză + P_i	−3,3
Izomerizare	
glucoză-1-P → glucoză-6-P	−1,7
Eliminare	
ac. malic → ac. fumaric + H_2O	+0,88
Condensare	
ac. glutamic + NH_3 → glutamină + H_2O	+3,4
ac. acetic + alc. etilic → acetat de etil + H_2O	+4,7
glicină + glicină → glicil-glicină + H_2O	+2,2

Scanned with OKEN Scanner

a energiei libere de reacție, face ca reacția să devină mai exergonică decît în condiții standard. Din contră, la concentrații ale reactanților mai mici decît cele standard desfășurarea reacției de la stînga la dreapta este îngreuiată, gradul de desfășurare spontană a reacției este diminuat, reacția devine mai puțin exergonică. La echilibru, cînd concentrațiile componenților sistemului sînt constante, viteza reacției directe fiind egală cu viteza reacției opuse, energia liberă de reacție este nulă. Capacitatea sistemelor de a efectua travalii este zero la echilibru. În tabelul VIII.1 se dau valorile energiilor libere de reacție standard ($\Delta G^{\circ\prime}$) pentru cîteva tipuri de reacții biochimice, de oxidare, de hidroliză, de condensare, de izomerizare. De remarcat efectele energetice intens negative ale reacțiilor de degradare oxidativă sau hidrolitică, în opoziție cu reacțiile de condensare care, din contră, sînt reacții intens endergonice. Reacțiile de izomerizare au în genere efecte energetice reduse.

1.3. POTENȚIALELE REDOX ȘI MODIFICĂRILE DE ENERGIE LIBERĂ

Reacțiile de oxidoreducere (reacții redox) constau într-un transfer de electroni între doi compuși, unul cedează electroni și se oxidează, este agentul reducător al celuilalt care acceptînd electroni se reduce. Reacțiile redox în soluție sînt reversibile astfel încît sistemul în echilibru va cuprinde formele redusă și oxidată ale ambilor compuși, A_{red}, A_{ox}, B_{red}, B_{ox}:

$$A_{red} + B_{ox} \rightleftharpoons A_{ox} + B_{red}$$

Cuplurile A_{red} și A_{ox} sau B_{red} și B_{ox} constituite din formele redusă și oxidată ale aceluiași compus, poartă denumirea de sistem redox. Astfel de cupluri, prin analogie cu perechile acid-bază, constituie perechi de oxidant și reducător conjugați. Un termen al perechii se transformă în celălalt prin transfer de electroni, după cum un acid dă naștere la baza sa conjugată prin pierdere de protoni.

Cele mai multe reacții redox din organism au loc prin hidrogenări și dehidrogenări. Aceste reacții implică totdeauna transfer de electroni, atomul de hidrogen fiind alcătuit dintr-un electron și un proton. Sistemul redox al hidrogenului este constituit din hidrogen molecular (forma redusă) și protoni (forma oxidată). În tabelul VIII.2, coloana 1, se dau exemple de sisteme redox din organismele vii.

Două sisteme redox ce se află într-o aceeași soluție vor interacționa prin trecerea electronilor de la sistemul cu afinitate mai mică pentru electroni (reducător) spre acela cu afinitate mai mare (oxidant). Sensul și intensitatea fluxului de electroni depinde de afinitățile relative ale celor două sisteme pentru electroni. Tendința sistemelor redox de a ceda sau primi electroni, caracterul lor oxidant sau reducător se măsoară cu ajutorul potențialelor redox (E). Aceste mărimi sînt diferențe de potențial între două sisteme redox cuprinse în soluții diferite, între care electronii pot circula prin intermediul a doi electrozi conectați printr-un conductor iar ionii circulă prin intermediul unui electrolit (KCl) încorporat într-un gel de agar. O astfel de instalație poartă denumirea de celulă de oxidoreducere, fiecare sistem redox constituie o semicelulă (fig. VIII.1). Diferența de potențial între cele două celule poate fi înregistrată cu ajutorul unui voltmetru intercalat în circuit și depinde de natura sistemelor redox din semicelule și de concentrațiile lor.

Scanned with OKEN Scanner

Pentru o caracterizare unitară a sistemelor redox se măsoară totdeauna diferența de potențial între o semicelulă cuprinzînd sistemul redox de cercetat, în concentrație 1M, și o semicelulă de referință, totdeauna aceeași. Sistemul redox de referință este electrodul normal de hidrogen. Acesta este o semicelulă cuprinzînd o soluție de acid tare cu $[H^+]=1$ în care se barbotează

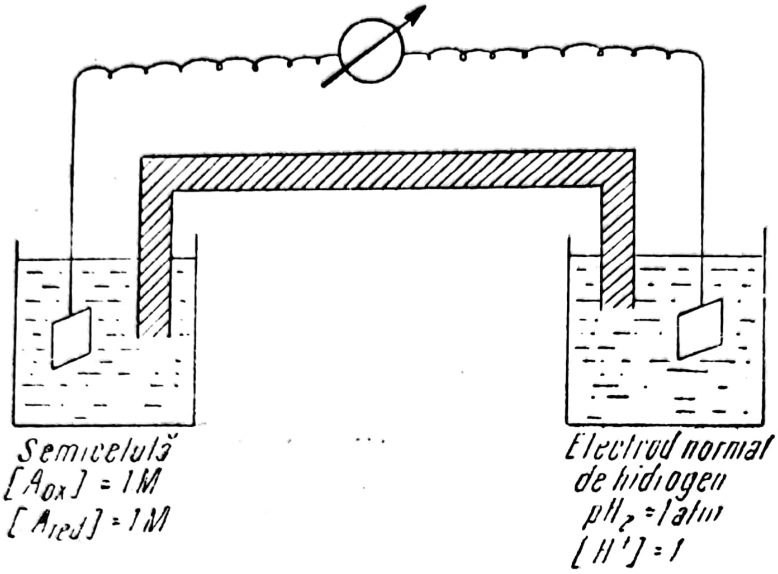


Fig. VIII.1. Celulă de oxidoreducere.

hidrogen la presiunea de o atmosferă. Prin convenție potențialul acestei semicelule este nul. Diferența de potențial înregistrată între semicelula de cercetat și electrodul normal de hidrogen definește potențialul redox standard al sistemului E_0. În biologie, nu se utilizează însă această constantă ci un potențial redox E_0', stabilit față de un electrod de hidrogen în care concentrația ionilor H^+ este de 10^{-7} ioni/l (pH=7). Potențialul acestei semicelule față de electrodul normal de hidrogen este de —0,42 volți, sistemul este reducător față de acela cuprinzînd forma oxidată (H_2) și pe cea redusă (H^+) în concentrații egale. În tabelul VIII.2, se dau potențialele redox standard (E_0')pentru unele cupluri redox biologice.

Ordonarea sistemelor redox după valorile potențialelor E_0' permite stabilirea sensului fluxului electronic. Un sistem redox oarecare oxidează

Tabelul VIII.2

Valorile E_0' ale unor sisteme redox biologice

Sistemul redox	E_0' (volți)
$\frac{1}{2}\ O_2 - O^{2-}$	+0,82
Citocrom c Fe^{3+} — citocrom c Fe^{2+}	+0,22
Coenzima Q — $CoQH_2$	+0,10
Succinat — fumarat	+0,03
Piruvat — lactat	—0,19
Etanol — acetaldehidă	—0,20
$NAD^+ - NADH + H^+$	—0,32
$NADP^+ - NADPH + H^+$	—0,32
$\frac{1}{2}\ H_2 - 2\ H^+$	—0,42

Scanned with OKEN Scanner

toate sistemele cu potenţiale mai mici, după cum el este oxidat de sistemele cu potenţiale mai mari, mai pozitive.

Trecerea electronilor de la un sistem redox la altul este cuplată cu variaţii puternice ale energiilor libere. Cu cît este mai mare căderea de potenţial, cu atît este mai pronunţat şi efectul energetic al procesului:

$$\Delta G^{\circ\prime} = -nF\Delta E_0'$$

unde:

n = număr de electroni transferaţi;

F = echivalentul caloric al unui faraday (23,062 Kcal);

$\Delta E_0'$ = diferenţa dintre potenţialele redox ale reactanţilor.

Cu ajutorul acestei relaţii se pot calcula valorile $\Delta G^{\circ\prime}$, avînd în vedere uşurinţa cu care se determină potenţialele redox. De exemplu, diferenţa dintre potenţialul redox al oxigenului şi al cuplului $NAD^+ — NADH + H^+$ este de 1,14 volţi [0,82—(—0,32)]. Din această valoare se calculează că reacţia: $NADH + H^+ + \frac{1}{2}O_2 \rightarrow NAD^+ + H_2O$ care înglobează o sumă de oxidări şi reduceri ce alcătuiesc lanţul respirator, corespunde unei căderi de energie liberă de —52,6 Kcal:

$$\Delta G^{\circ\prime} = -nF\Delta E_0' = -2 \times 23{,}062 \times 1{,}14 = -52{,}6 \text{ Kcal.}$$

2. CUPLAREA ENERGETICĂ A REACŢIILOR ENDERGONICE ŞI EXERGONICE

Reacţiile catabolice, de degradare, sînt reacţii exergonice, ele au loc cu scăderea energiei libere a reactanţilor; din contră, reacţiile anabolice, de biosinteză, nu pot avea loc de la sine deoarece ele presupun un aport de energie din afară. De fapt, în organismele vii aceste procese sînt cuplate, energia mobilizată în catabolism serveşte la compensarea efectului energetic nefavorabil al reacţiilor anabolice. În acest subcapitol se studiază tocmai dispozitivele moleculare cu ajutorul cărora energia este transferată de la un proces la altul. Acest transfer se realizează prin participarea unui aceluiaşi compus, atît la reacţia exergonică, cît şi la cea endergonică. Pentru ca acest intermediar comun, I, să poată îndeplini funcţia de transportor de energie liberă între două reacţii chimice, el trebuie să poată exista în două forme, una mai săracă în energie, I, şi o formă bogată în energie, o formă energizată, I*. În reacţia exergonică intermediarul înmagazinează energie chimică, pe care o cedează apoi în reacţia endergonică. Prin oscilaţia intermediarului între forma săracă şi cea bogată în energie $I \rightleftharpoons I^*$, se poate realiza transferul de energie între două secvenţe de reacţii, una cu bilanţ energetic negativ ($\Delta G < 0$) şi alta cu bilanţ energetic pozitiv ($\Delta G > 0$) (Fig. VIII.2).

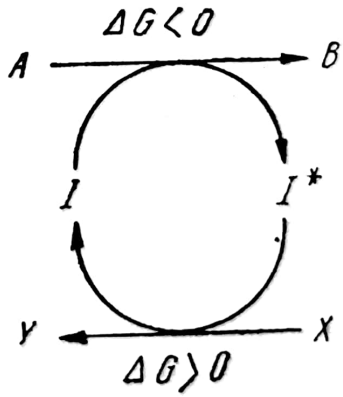


Fig. VIII.2. Ilustrarea schematică a cuplării energetice printr-un intermediar comun.

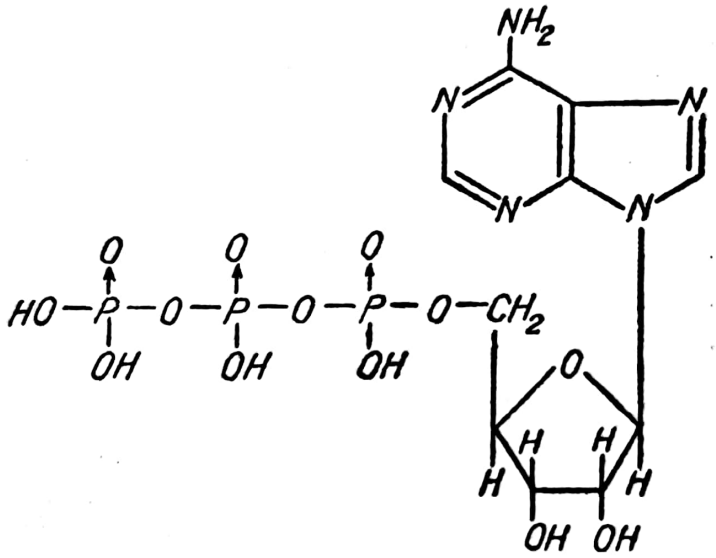
Compusul care îndeplineşte în lumea vie funcţia de transportor de energie liberă între reacţiile exergonice şi endergonice este ATP-ul sau mai bine zis sistemul alcătuit din ATP plus ADP şi fosfat anorganic (P_i). ATP-ul reprezintă

Scanned with OKEN Scanner

forma energizată a intermediarului comun, iar ADP-ul și fosfatul anorganic, produșii scindării sale hidrolitice, reprezintă forma săracă în energie a ATP-ului. În ATP energia este înmagazinată în legături chimice cu potențiale chimice ridicate, denumite legături macroergice. Hidroliza unei astfel de legături este asociată cu mobilizarea unei cantități mari de energie liberă. Alături de ATP în lumea vie există mulți compuși cu legături macroergice și care joacă roluri importante în transferul de energie.

2.1. LEGĂTURI MACROERGICE ȘI COMPUȘI MACROERGICI

ATP-ul, adenozin-trifosfatul, este un nucleotid purinic a cărui formulă este redată mai jos:



Descompunerea hidrolitică a ATP-ului la ADP și acid fosforic (P_i) este o reacție puternic exergonică:

$$ATP + HOH \rightarrow ADP + H_3PO_4$$

$$\Delta G^{\circ\prime} = -7{,}3 \text{ Kcal}$$

De asemenea, reacția de hidroliză a ADP-ului la AMP (adenozin-monofosfat) are o energie liberă de reacție la fel de negativă ca și detașarea primului rest fosforil:

$$ADP + HOH \rightarrow AMP + H_3PO_4$$

$$\Delta G^{\circ\prime} = -7{,}3 \text{ Kcal}$$

În schimb, hidroliza AMP-ului la adenozină și acid fosforic are un bilanț energetic mult mai puțin negativ:

$$AMP + HOH \rightarrow \text{adenozină} + H_3PO_4$$

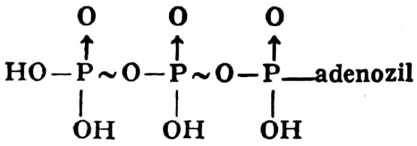
$$\Delta G^{\circ\prime} = -3{,}4 \text{ Kcal}$$

Examinarea a numeroase reacții de hidroliză a unor compuși fosforilați a scos în evidență deosebiri foarte mari în ceea ce privește valorile energiilor lor libere de reacție ($\Delta G^{\circ\prime}$). ATP-ul cuprinde legături fosforice cu potențiale chimice

Scanned with OKEN Scanner

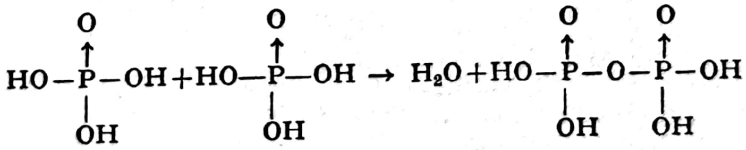
diferite, cele două legături fosforice terminale sînt hidrolizate în reacţii mult mai exergonice ($\Delta G^{\circ\prime} = -7{,}3$ Kcal) decît scindarea ultimului rest fosforil ($\Delta G^{\circ\prime} = -3{,}4$ Kcal). Ţinîndu-se seama de valorile energiilor libere a reacţiilor de hidroliză s-a introdus în biochimie conceptul de legătură macroergică şi de compus macroergic. *Legătura covalentă care este hidrolizată într-o reacţie puternic exergonică este denumită legătură macroergică.* Valoarea limită inferioară a energiei libere de reacţie pentru hidroliza unei legături macroergice este de aproximativ 7—8 Kcal. (în condiţii standard). Această valoare este arbitrar aleasă, ea corespunde valorilor $\Delta G^{\circ\prime}$ pentru hidroliza legăturilor fosforice din ATP, compus ce joacă un rol central în transferul de energie. O legătură macroergică este desemnată cu ajutorul semnului ~ care înlocuieşte linia simplă, —, a covalenţei. Un compus care cuprinde una sau mai multe legături macroergice este denumit el singur compus macroergic.

ATP-ul este un compus macroergic, el cuprinde două legături fosforice macroergice:



ADP-ul cuprinde o singură legătură macroergică. În AMP restul fosforil este legat esteric la gruparea alcoolică de la atomul C'-5 al ribozei şi acest compus nu este macroergic. În afară de ADP şi ATP, sînt compuşi macroergici toţi nucleozido-difosfaţii (cu cîte o legătură macroergică) şi toţi nucleozido-trifosfaţii (cu cîte două legături macroergice). Aceştia sînt: guanozin-difosfatul (GDP) şi guanozin-trifosfatul (GTP) — nucleotide purinice şi citidin-difosfat (CDP), citidin-trifosfat (CTP), uridin-trifosfat (UDP), uridin-trifosfat (UTP), timidin-difosfat (TDP) şi timidin-trifosfat (TTP) — nucleotide pirimidinice.

Legăturile macroergice din nucleotide sînt legăturile care reunesc două resturi de acid fosforic, sînt legături de anhidridă de acid. Acestor legături li se mai spune şi legături pirofosforice, de la numele acidului pirofosforic care rezultă formal din două molecule de acid fosforic printr-o reacţie de anhidrizare (eliminare de apă):



Legătura din acidul pirofosforic este ea singură macroergică:

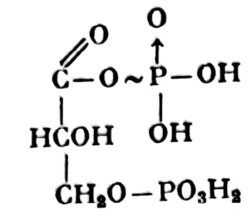
$$H_4P_2O_7 + H_2O \rightarrow 2\,H_3PO_4$$

$$\Delta G^{\circ\prime} = -8 \text{ Kcal}$$

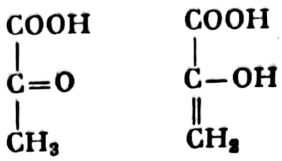
Legăturile macroergice de tip anhidridă de acid la care participă acidul fosforic se află în structura multor metaboliţi intermediari cu roluri importante în transferul de energie. Un astfel de compus este acidul 1,3-difosfogliceric. Acesta derivă din acidul gliceric în care un rest fosforil este legat esteric la gruparea alcoolică de la C-3, iar celălalt fosforil formează o anhidridă de acid cu gruparea carboxil. În acest compus numai legătura anhidridică

Scanned with OKEN Scanner

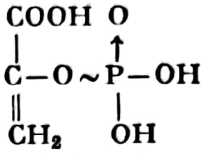
carboxil-fosforică este macroergică ($\Delta G^{0\prime} = -11{,}8$ Kcal), pe cînd legătura fosfoesterică are un $\Delta G^{0\prime}$ de numai -3 Kcal.



Acid 1,3-difosfogliceric



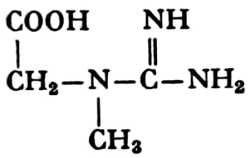
Acid piruvic



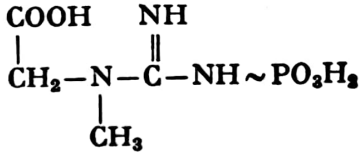
Acid fosfoenolpiruvic

Un alt compus macroergic fosforilat este acidul fosfoenolpiruvic. ΔG^{0} pentru legătura sa macroergică are una din cele mai negative valori ($-14{,}8$ Kcal) cunoscute. Acest compus este esterul fosforic al formei enolice a acidului piruvic.

Unii compuşi fosforilaţi macroergici cuprind restul fosforil legat la un atom de azot. Un astfel de compus este fosfocreatina, care îndeplineşte în fiziologia muşchilor scheletici rolul unui mic rezervor de energie chimică:



creatină



fosfocreatină

Compuşii macroergici citaţi pînă acum sînt compuşi fosforilaţi. Alţi compuşi din această grupă vor fi întîlniţi mai departe la studiul metabolismului intermediar. În tabelul VIII.3 se dau valorile $\Delta G^{0\prime}$ pentru principalii compuşi macroergici.

Tabelul VIII.3

Valorile $\Delta G^{0\prime}$ ale unor compuşi macroergici

Compusul	Reacţia de hidroliză	$\Delta G^{0\prime}$ (Kcal)
ATP	$ATP + HOH \rightarrow ADP + P_i$	$-7{,}3$
ADP	$ADP + HOH \rightarrow AMP + P_i$	$-7{,}3$
$H_4P_2O_7$	$H_4P_2O_7 + HOH \rightarrow 2\,P_i$	$-8{,}0$
Acid fosfoenolpiruvic	Acid fosfoenolpiruvic + HOH → acid piruvic + $+P_i$	$-14{,}8$
Acid 1,3 difosfogliceric	Acid 1, 3-difosfogliceric + HOH → acid 3-fosfogliceric + P_i	$-11{,}8$
Fosfocreatină	Fosfocreatină + HOH → creatină + P_i	$-10{,}3$
Acid carbamilfosforic	Acid carbamilfosforic + HOH → acid carbamic + P_i	-7
Acid acetilfosforic	Acid acetilfosforic + HOH → acid acetic + $+P_i$	$-10{,}1$
Acetil-CoA	Acetil-CoA + HOH → acid acetic + CoASH	$-8{,}5$

Unii compuşi macroergici cuprind legături la care nu participă acidul fosforic. O categorie de acest gen sînt tiolesterii $R-CO\sim S-R'$, ca de exemplu, acetil-coenzima A, $CH_3-CO\sim S-CoA$ sau în general, orice acil-CoA, $R-CO\sim S$-CoA.

Scanned with OKEN Scanner

Legăturile macroergice din tiolesteri sînt legături cu potenţiale chimice deosebit de ridicate. Acetil-coenzima A are un $\Delta G^{\circ\prime}$ de −8,5 Kcal.

Se pune problema de ce unele reacţii de hidroliză sînt mult mai exergonice decît altele, de ce este favorizată formarea produşilor de hidroliză? Din examinarea diverşilor compuşi citaţi mai înainte drept compuşi macroergici a rezultat că legăturile de anhidridă de acid, legăturile pirofosforice sau cele carboxil-fosforice, sînt prezente în cei mai mulţi compuşi de acest gen. Principalul factor care imprimă legăturilor anhidridice caracter macroergic este stabilizarea prin rezonanţă a acizilor care rezultă prin hidroliză. În cazul scindării hidrolitice a unei legături carboxil-fosforică:

$$R-CO-O-PO_3H_2+HOH \rightarrow R-COOH+H_3PO_4$$

atît acidul carboxilic cît şi acidul fosforic prezintă fiecare mai multe structuri limită în rezonanţă şi aşa cum se ştie, multiplicitatea formelor rezonante este un factor stabilizator pentru acea structură. La hidroliza acidului pirofosforic:

$$H_4P_2O_7+HOH \rightarrow 2\,H_3PO_4$$

acidul fosforic este stabilizat prin rezonanţă în raport cu acidul pirofosforic. Acest factor este o explicaţie şi pentru tendinţa spre hidroliză a legăturilor pirofosforice din diverse nucleotide.

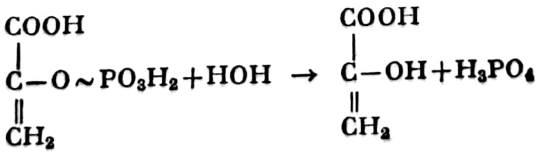
Un factor adiţional care favorizează reacţia de hidroliză a unor compuşi fosforilaţi este diminuarea repulsiilor electrostatice dintre sarcini de acelaşi fel din molecula reactantului. Prin hidroliză aceste sarcini sînt despărţite, ionii putîndu-se mişca liber în soluţie. Compuşii fosforilaţi sînt ionizaţi în soluţie şi dacă ţinem seama de acest fapt, reacţia de hidroliză a ATP-ului trebuie scrisă:

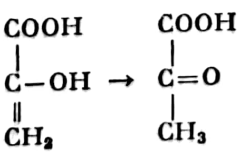
$$ATP^{4-}+H_2O \rightarrow ADP^{3-}+H_2PO_4^-$$

În ATP există patru sarcini negative învecinate iar după hidroliză numărul acestora este redus la trei. La fel, reacţia de hidroliză a ADP-ului diminuează repulsiile electrostatice:

$$ADP^{3-}+HOH \rightarrow AMP^{2-}+H_2PO_4^-$$

În molecula acidului fosfoenolpiruvic legătura macroergică este enolfosforică. Valoarea $\Delta G^{\circ\prime}$ a acestei legături este mult mai negativă decît a legăturilor pirofosforice. În acest caz, pe lîngă factorii menţionaţi mai înainte, se adaugă şi faptul că acidul enolpiruvic, produsul imediat al hidrolizei, se tautomerizează cvasi-complet în forma cetonică, mult mai stabilă. Dispariţia, prin tautomerizare a unuia dintre produşii de hidroliză, favorizează desfăşurarea reacţiei de la stînga la dreapta:





2.2. ROLUL ATP-ului ÎN TRANSFERUL DE ENERGIE

ATP-ul are o moleculă complexă şi părţile sale componente, nucleul purinic şi restul de riboză, sînt sintetizate în celule în secvenţe cuprinzînd numeroase reacţii individuale. Din punctul de vedere al funcţiei ATP-ului drept transportor de energie metabolică, este importantă doar sinteza legăturilor macroergice din acest compus şi utilizarea energiei acestora. În reacţiile de transfer de energie nu sînt implicate decît legăturile pirofosforice din ATP.

Reacţia primară prin care se conservă energie în molecula de ATP este:

$$ADP + H_3PO_4 \rightarrow ATP + H_2O$$

denumită reacţie de fosforilare a ADP-ului. Este puternic endergonică ($\Delta G^{\circ\prime} = +7{,}3$ Kcal) şi nu poate avea loc decît în condiţii în care este cuplată cu o reacţie metabolică exergonică. Legătura macroergică cuprinsă în molecula de ADP provine de fapt tot din legătura fosforică terminală din ATP. În organismele animale nu are loc niciodată fosforilarea directă a AMP-ului:

$$AMP + H_3PO_4 \rightarrow ADP + H_2O$$

similară cu cea de sinteză a ATP-ului. Reacţia de sinteză energetică a ADP-ului este următoarea:

$$ATP + AMP \rightleftharpoons 2ADP$$

Aceasta constă în transferul unui rest fosforil cu potenţial chimic ridicat din molecula de ATP pe aceea de AMP. Efectul energetic al procesului este practic nul, valoarea $\Delta G^{\circ\prime}$ a legăturii care se rupe este numeric egală, dar de semn contrar, cu valoarea $\Delta G^{\circ\prime}$ a legăturii care se formează. Această reacţie este uşor reversibilă şi este catalizată de enzima adenilat-kinază sau miokinază.

Prin scindarea legăturilor pirofosforice din ATP se mobilizează energie care este utilizată de celule pentru îndeplinirea diverselor activităţi vitale. Energia înmagazinată în ATP poate fi utilizată în două moduri. În primul rînd, prin scindarea hidrolitică a ultimului rest fosforil:

$$ADP + HOH \rightarrow ADP + P_i$$

reacţie cu $\Delta G^{\circ\prime} = -7{,}3$ Kcal. Un al doilea mod de utilizare energetică a ATP-ului are loc prin detaşarea acidului pirofosforic (PP_i):

$$ATP + HOH \rightarrow AMP + PP_i$$

Această reacţie are $\Delta G^{\circ\prime}$ tot de $-7{,}3$ Kcal. În molecula acidului pirofosforic se păstrează o legătură macroergică. Totuşi în celule acidul pirofosforic este hidrolizat imediat sub acţiunea catalitică a unei hidrolaze, pirofosfataza:

$$H_4P_2O_7 + H_2O \rightarrow 2\,H_3PO_4$$

ceea ce face ca în acest mod de utilizare energetică a ATP-ului să se consume efectiv ambele legături macroergice.

Trebuie subliniat că energia legăturii macroergice din ADP nu poate fi folosită prin scindarea sa hidrolitică la AMP:

$$ADP + HOH \rightarrow AMP + P_i$$

Scanned with OKEN Scanner

după cum nu este posibilă nici reacţia inversă. Energia conservată în legătura macroergică din ADP poate fi utilizată numai prin intermediul reacţiei catalizate de adenilat-kinază:

$$2\,ADP \rightleftharpoons ATP + AMP$$

cînd are loc transferul restului fosforil dintr-o moleculă de ADP pe alta de acelaşi fel. Această spoliere a nucleotidului de fosfat macroergic are loc doar în cazuri de urgenţă, cînd rezervele energetice ale celulelor sînt epuizate. Este cazul de pildă al unor muşchi care efectuează contracţii puternice în anaerobioză.

În subcapitolul următor vor fi prezentate cîteva modalităţi de utilizare metabolică a ATP-ului după care vor fi reluate şi dezvoltate căile generale de sinteză a ATP-ului.

2.2.1. UTILIZAREA METABOLICĂ A ATP-ULUI

Diversele activităţi pe care le desfăşoară o celulă sau un organism pluricelular au loc cu cheltuială de energie care este furnizată imediat de ATP. În primul rînd, activitatea metabolică de dezvoltare şi de întreţinere a structurilor celulare implică consum de energie. De asemenea, contracţia şi mişcarea sînt procese endergonice cuplate energetic cu hidroliza ATP-ului. Activitatea nervoasă şi alte procese vitale presupun travalii osmotice care au loc tot pe seama energiei înmagazinată în ATP. Pentru ilustrarea modului în care ATP-ul serveşte la promovarea unor reacţii endergonice vor fi prezentate cîteva reacţii de utilizare metabolică a ATP-ului. La descrierea metabolismului principalilor componenţi celulari vor fi întîlnite încă multe alte exemple.

Metaboliţii primari, monozaharidele, acizii graşi, aminoacizii participă la reacţiile metabolice, de sinteză sau de degradare, în forme active, cu potenţiale chimice mai ridicate. ATP-ul furnizează energia necesară acestor activări.

Glucoza intră în diversele secvenţe de degradare sau participă la alte reacţii sub formă de ester fosforic, glucozo-6-fosfat. Legătura fosforică a acestui compus nu este macroergică, totuşi valoarea $\Delta G^{\circ\prime}$ este suficient de pozitivă (+3,3 Kcal) pentru ca sinteza sa din glucoză şi acid fosforic să fie puţin probabilă. Glucozo-6-fosfatul este obţinut în celule prin transferul restului fosforil din ATP pe glucoză:

$$\text{glucoză} + ATP \rightarrow \text{glucozo-6-fosfat} + ADP$$

Valoarea $\Delta G^{0\prime}$ pentru această reacţie va fi dată de suma valorilor $\Delta G^{0\prime}$ ale legăturii fosforice din ATP care a fost scindată (—7,3 Kcal) şi a legăturii sintetizate (+3,3 Kcal). Fosforilarea glucozei pe seama ATP-ului este prin urmare o reacţie exergonică, $\Delta G^{\circ\prime} = -4$ Kcal, care se va desfăşura cu uşurinţă de la stînga la dreapta.

Glicerolul este utilizat metabolic numai ca ester fosforic, glicerol-fosfat. Sinteza acestui compus are loc tot pe seama unui rest fosforil din ATP:

$$\text{glicerol} + ATP \rightarrow \text{glicerol-fosfat} + ADP$$

reacţie catalizată de enzima glicerolkinază.

Scanned with OKEN Scanner

Formele activate ale aminoacizilor sînt derivaţii aminoacil-t-ARN. Sinteza acestora este posibilă prin furnizare de energie de către ATP. Ecuaţia globală a acestei activări (catalizată de aminoacil-t-ARN sintetaze) este:

$$R-\underset{\displaystyle NH_2}{\underset{|}{CH}}-COOH+t-ARN+ATP \rightarrow R-\underset{\displaystyle NH_2}{\underset{|}{CH}}-CO-O-t-ARN+AMP+PP_i$$

Derivaţii metabolic activi ai unor compuşi cu grupări —COOH sînt esteri tiolici ai acestora. De exemplu, acizii graşi participă la reacţiile de degradare sau de sinteză sub formă de esteri cu coenzima A, R—CO~S—CoA. Activarea acizilor graşi la acil-CoA este cuplată cu scindarea legăturilor macroergice din ATP:

$$R-COOH+ATP+CoASH \rightarrow R-CO\sim S-CoA+AMP+PP_i$$

Formarea legăturii amidice din aminoacidul glutamină este un proces endergonic şi în celule reacţia este posibilă prin cheltuirea energiei unei legături macroergice din ATP (care serveşte la activarea acidului glutamic), reacţia globală de sinteză a glutaminei devenind exergonică:

$$\text{acid glutamic}+NH_3+ATP \rightarrow \text{glutamină}+ADP+P_i$$

Cu toate că ATP-ul joacă un rol central în transferul energiei chimice în celule, totuşi trebuie menţionat că şi ceilalţi nucleozido-trifosfaţi, CTP, GTP, UTP, sînt utilizaţi ca donatori de energie. Astfel, uridin-trifosfatul (UTP) este utilizat pentru activarea glucozei la derivatul UDP-glucoză; CTP-ul joacă un rol similar în metabolismul lipidic. Sinteza legăturilor peptidice consumă energie furnizată atît de ATP cît şi de GTP. În sfîrşit, la sinteza legăturilor internucleotidice din acizii nucleici participă numai nucleozido-trifosfaţii cu riboză (ATP, GTP, CTP, UTP) sau dezoxiriboză (d-ATP, d-GTP, d-CTP, TTP) şi în reacţiile catalizate de ARN sau ADN-sintetaze legăturile fosfodiesterice care leagă unităţile constitutive în lanţuri polinucleotidice se realizează pe seama scindării legăturilor macroergice din mononucleotide.

În aceste ultime exemple reacţia endergonică a fost cuplată cu cea exergonică de scindare a legăturilor pirofosforice macroergice din alte nucleotide decît ATP-ul. Totuşi trebuie precizat că legăturile macroergice din aceşti compuşi provin tot din ATP prin intermediul unei reacţii:

$$ATP+XDP \rightarrow ADP+XTP$$

unde X poate fi uridină, guanozină, citidină, dezoxiadenozină, dezoxiguanozină, dezoxicitidină sau timidină.

2.2.2. SINTEZA ENERGETICĂ A ATP-ULUI

Aşa cum s-a arătat mai sus, reacţia primară de sinteză a legăturilor macroergice din ATP este fosforilarea ADP-ului:

$$ADP+P_i \rightarrow ATP+H_2O$$

reacţie posibilă numai prin aport de energie metabolică. Vom examina mai departe care sînt reacţiile metabolice exergonice care furnizează energie chimică pentru fosforilarea ADP-ului şi care sînt mecanismele moleculare de cuplare ale celor două procese.

Scanned with OKEN Scanner

Reacţiile chimice care au efectele energetice cele mai pronunţate sînt reacţiile de oxidare şi de reducere. Din tabelul VIII.2 în care se dau valorile $\Delta G°$ pentru cîteva tipuri de reacţii este evident că reacţiile de oxidare sînt cele mai exergonice, au valori de sute de ori mai mari decît efectele energetice ale altor tipuri de reacţii. În mod reciproc, reacţiile de reducere sînt reacţii puternic endergonice. Din aceste motive reacţiile de oxidare ale unor constituenţi celulari sînt reacţiile care mobilizează cantităţi însemnate de energie şi aceasta este utilizată pentru sinteză de ATP. Oxidarea completă a glucozei la bioxid de carbon şi apă:

$$C_6H_{12}O_6 + 6\ O_2 \rightarrow 6\ CO_2 + 6\ H_2O$$

are $\Delta G°' = -686$ Kcal/mol.

Acidul palmitic, acidul gras cel mai răspîndit în organismul omului, este oxidat complet într-o reacţie cu $\Delta G°'$ încă şi mai negativ:

$$CH_3-(CH_2)_{14}-COOH + 23\ O_2 \rightarrow 16\ CO_2 + 16\ H_2O$$

$$\Delta G°' = -2\ 338 \text{ Kcal/mol}$$

Aminoacizii, joacă şi ei rolul de substrate energetice putînd fi degradaţi oxidativ la bioxid de carbon, apă şi amoniac.

2.2.3. GENERALITĂŢI CU PRIVIRE LA DESFĂŞURAREA REACŢIILOR DE OXIDARE BIOLOGICĂ

Oxigenul luat din atmosferă este agentul oxidant final pentru reacţiile oxidative care au loc în majoritatea organismelor vii. Din aceste motive existenţa acestora este obligatoriu dependentă de prezenţa aerului. Reacţiile de degradare a substratelor energetice ale organismului — glucide, grăsimi, aminoacizi — au loc în numeroase reacţii individuale organizate în secvenţe cu localizări intracelulare şi factori de control distincţi. Reacţiile oxidative ale acestor secvenţe au loc unele fără participarea oxigenului, sînt oxidări anaerobe, în opoziţie cu reacţii de oxidare la care participă oxigenul, oxidări aerobe. Etapa oxidativă anaerobă a unui metabolit constă în reacţii succesive de dehidrogenare, gradul de oxidare a produşilor crescînd pe măsură ce substanţa sărăceşte în hidrogen. Prin reacţii auxiliare de hidratare, urmate de dehidrogenări, substratele se îmbogăţesc şi în oxigen. Ilustrăm acest gen he degradare prin oxidarea unei grupări metilenice ($-CH_2-$) dintr-o catenă didrocarbonată saturată la grupare carbonilică ($-CO-$):

$$-CH_2-CH_2- \xrightarrow[-2H]{} -CH=CH- \xrightarrow[+HOH]{} -\underset{\displaystyle OH}{\underset{|}{CH}}-CH_2- \xrightarrow[-2H]{} -\overset{\displaystyle O}{\overset{\|}{C}}-CH_2-$$

La fel, oxidarea unei grupări alcoolice primare la grupare carboxilică implică două dehidrogenări separate de o reacţie de hidratare:

$$-CH_2OH \xrightarrow[-2H]{} -C\overset{O}{\underset{H}{<}} \xrightarrow{+HOH} -CH\overset{OH}{\underset{OH}{<}} \xrightarrow{-2H} -C\overset{O}{\underset{OH}{<}}$$

alcool — aldehidă — hidratul aldehidei — acid

În aceste reacţii de dehidrogenare atomii de hidrogen ai substratelor sînt transferaţi pe acceptori specifici care sînt de fapt, fie o coenzimă piri-

Scanned with OKEN Scanner

dinică (NAD^+ sau $NADP^+$), fie una flavinică (FMN sau FAD). Transferul este catalizat enzimatic de dehidrogenaze. În rezumat, etapa oxidativă anaerobă poate fi redată prin ecuația:

$$SH_2 + Co_{ox} \rightarrow S_{ox} + CoH_2$$

În etapa oxidativă aerobă participă oxigenul molecular care acceptă atomii de hidrogen care au fost labilizați în etapa precedentă:

$$CoH_2 + \tfrac{1}{2}O_2 \rightarrow Co_{ox} + H_2O$$

Cele două etape sînt interdependente, nici una din ele nu are loc în absența celeilalte. Etapa aerobă eliberează coenzimele în stare oxidată pentru a putea participa la alte reacții de dehidrogenare. În etapa anaerobă se mobilizează hidrogen care este substratul fazei aerobe.

Reacțiile de dehidrogenare ca și oxidările la care participă oxigenul sînt reacții exergonice, însă efectul energetic al primelor este inferior reacției de oxidare a hidrogenului. De exemplu, din cele 686 Kcal pe care le liberează degradarea oxidativă a glucozei numai 78 Kcal sînt mobilizate în faza anaerobă a procesului, restul de 608 Kcal reprezintă efectul energetic al combinării hidrogenului cu oxigenul molecular.

Energia mobilizată în ambele tipuri de reacții este utilizată pentru promovarea sintezei endergonice a ATP-ului:

$$ADP + P_i \rightarrow ATP + H_2O$$

Numai un număr redus de reacții de dehidrogenare a substratelor sînt cuplate cu sinteză de ATP. Cantități mult mai mari de ATP sînt sintetizate pe seama energiei furnizate de combinarea hidrogenului cu oxigenul molecular în concordanță cu efectul energetic mult superior al acestui proces.

3. FOSFORILĂRI OXIDATIVE CUPLATE CU OXIDAREA UNOR METABOLIȚI

Acest gen de sinteză a ATP-ului constă într-un ansamblu de reacții în care energia mobilizată prin dehidrogenarea unui metabolit, a unui substrat energetic, este utilizată imediat pentru fosforilarea ADP-ului la ATP. Procesului — în ansamblu — i se spune fosforilare oxidativă cuplată cu oxidare de substrat. Celulele animale dispun numai de trei reacții de acest gen și două dintre ele sînt etape în secvența anaerobă de degradare a glucozei. Aceste fosforilări reprezintă unica modalitate de sinteză a ATP-ului în anaerobioză. O a treia fosforilare oxidativă cuplată cu oxidarea unui substrat face parte din ciclul acizilor tricarboxilici, secvență de degradare oxidativă a resturilor de acid acetic provenind din diversele substanțe nutritive (glucoză, acizi grași și aminoacizi). Vom examina imediat aceste reacții de fosforilare urmînd ca la descrierea completă a secvențelor de reacții din care fac parte să rezulte mai pregnant semnificația lor metabolică.

Fosforilările oxidative cuplate cu oxidarea de substrate au loc, potrivit unui mecanism general, care poate fi schematizat astfel:

Scanned with OKEN Scanner

Reacţia de dehidrogenare exergonică are loc în prezenţa unui compus, notat cu X, care înmagazinează într-o legătură macroergică o parte a energiei procesului:

$$SH_2 + Co_{ox} + X \rightarrow S_{ox} + CoH_2 + \sim X$$

Energia compusului macroergic $\sim X$ serveşte apoi la obţinerea unui compus fosforilat macroergic:

$$\sim X + P_i \rightarrow X + \sim P$$

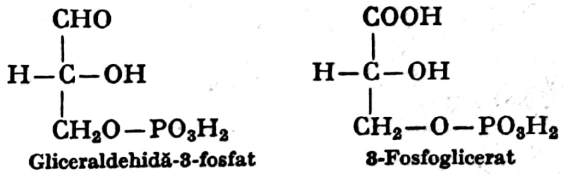
În sfîrşit, formarea ATP-ului are loc prin transferul restului fosforil cu potenţial chimic ridicat pe ADP:

$$\sim P + ADP \rightarrow ATP$$

Reacţia model care decurge după acest mecanism este sinteza de ATP descrisă imediat mai departe.

3.1. SINTEZA DE ATP CUPLATĂ CU OXIDAREA GLICERALDEHIDEI-3-FOSFAT

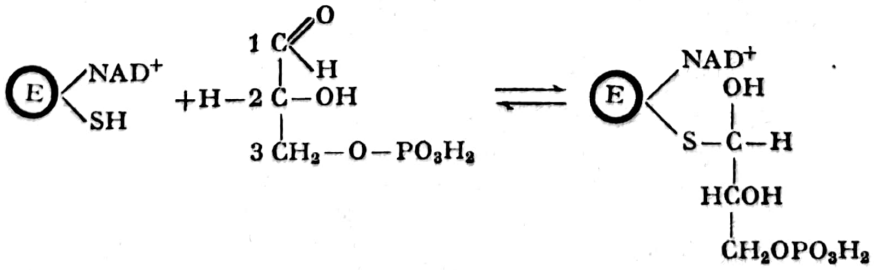
Esterul fosforic al gliceraldehidei este un intermediar al secvenţei glicolitice. Într-o reacţie complexă acest compus este oxidat la acid 3-fosfogliceric (sau 3-fosfoglicerat). Transformarea grupării —CHO în —COOH, reacţie puternic exergonică, este cuplată cu sinteză de ATP.



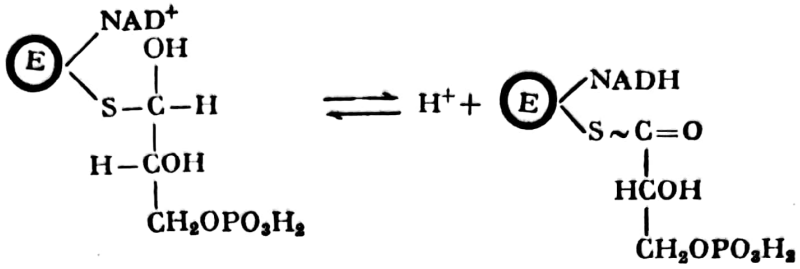
Gliceraldehidă-3-fosfat — 3-Fosfoglicerat

Procesul decurge potrivit mecanismului descris anterior cu participarea a două proteine enzimatice: gliceraldehidă-3-fosfat dehidrogenaza şi 1, 3-difosfoglicerat kinaza. Dehidrogenaza cuprinde în centrul activ grupări —SH libere provenind din resturi de cisteină şi coenzima NAD. Fixarea NAD-ului în centrul catalitic al enzimei este o situaţie puţin obişnuită deoarece coenzimele piridinice, NAD şi NADP, sînt de obicei asociate doar funcţional cu proteinele enzimatice. Ţinîndu-se seama de grupările din centrul activ gliceraldehidă-3-fosfat dehidrogenaza va fi reprezentată:

Procesul începe prin adiţia substratului la gruparea —SH din centrul activ al enzimei şi se formează un derivat analog semiacetalilor (un tiosemiacetal):

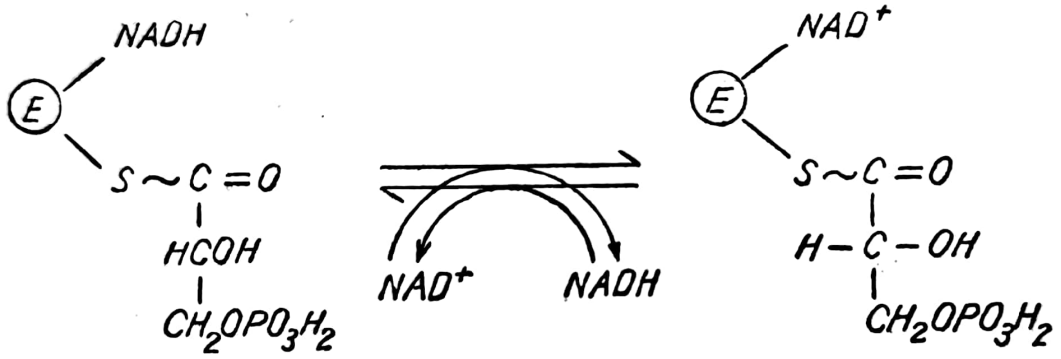


Reacţia următoare este etapa oxidativă în care gruparea aldehidică (sub formă semiacetalică) cedează doi atomi de hidrogen (de fapt un electron şi un atom de hidrogen) grupării coenzimice legate:

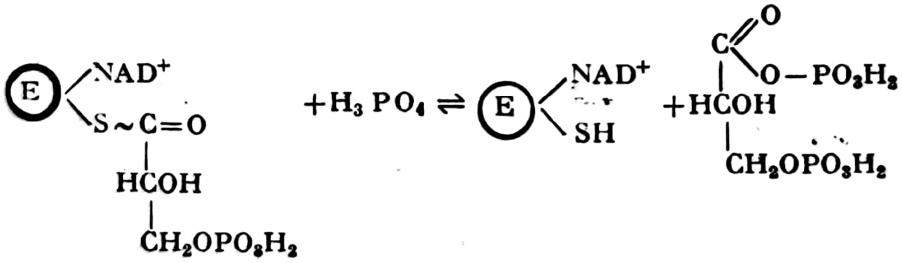


Este etapa cheie a procesului, atomul C-1 se oxidează de la stadiul de carbonil la cel de carboxil, obţinîndu-se esterul tiolic al acidului 3-fosfogliceric. În această etapă se mobilizează o cantitate mare de energie care este conservată parţial în legătura macroergică tiolesterică.

În etapa următoare are loc un schimb între coenzima redusă din centrul activ al enzimei şi coenzima oxidată din soluţie, reacţie cu un efect energetic nul:

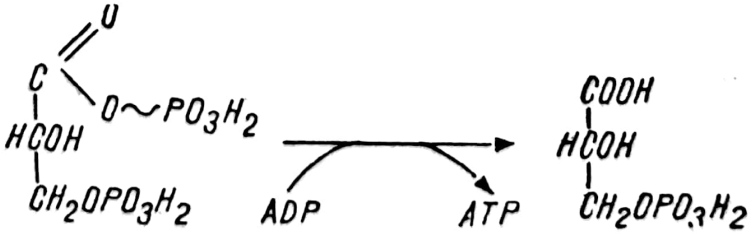


Urmează apoi intervenţia acidului fosforic (P_i) rezultînd acidul 1, 3-difosfogliceric. Legătura anhidridică macroergică a acestui compus este obţinută pe seama energiei legăturii tiolesterice ce se rupe:



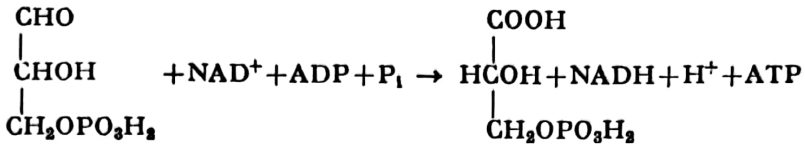
Enzima este eliberată devenind disponibilă pentru a participa la un nou ciclu catalitic.

Următoarea reacţie este catalizată de o enzimă distinctă, 1, 3-difosfoglicerat kinaza şi constă în ruperea legăturii anhidridice şi transferul restului fosforil pe molecula de ADP:



Scanned with OKEN Scanner

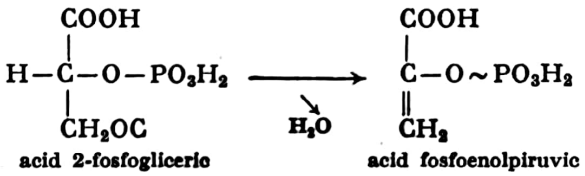
Prin însumarea reacţiilor parţiale se obţine ecuaţia globală a procesului:



care scoate în evidenţă cele două reacţii cuplate, oxidarea atomului C-1 de la stadiul de aldehidă la cel de acid şi sinteza cuplată de ATP. Trebuie subliniat că atomii de hidrogen legaţi sub formă de NADH reprezintă şi ei o cantitate mare de energie chimică potenţială care va fi eliberată atunci cînd aceşti atomi de hidrogen se combină cu oxigenul în lanţul respirator.

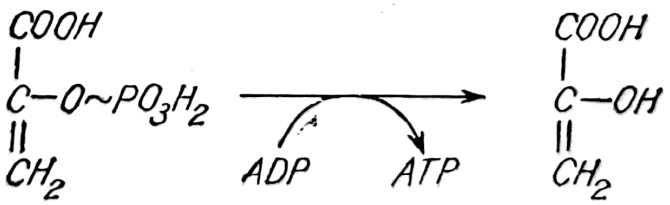
3.2. SINTEZA DE ATP CUPLATĂ CU TRANSFORMAREA ACIDULUI 2-FOSFOGLICERIC ÎN ACID PIRUVIC

Această fosforilare este cuprinsă şi ea în secvenţa glicolitică. Compusul iniţial este acidul 2-fosfogliceric iar cel final este acidul piruvic. Reacţia are loc în două etape catalizate de enzime distincte. Prima etapă constă într-o deshidratare a acidului 2-fosfogliceric catalizată de o liază, enolaza, rezultînd acidul fosfoenolpiruvic:

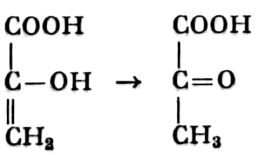


Trebuie remarcat că deshidratarea care a transformat legătura alcool-fosforică într-o legătură enol-fosforică a determinat totodată ridicarea potenţialului chimic al restului fosforil. Cu toate că nu are loc o dehidrogenare putem spune însă că a avut loc o oxidoreducere intramoleculară, din două grupări alcoolice obţinem o grupare carbonil (în formă enolică) şi o grupare metil.

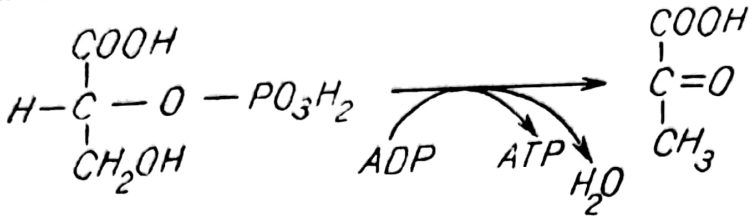
Într-o a doua reacţie catalizată de fosfoenolpiruvat kinază grupul fosforil activ este transferat pe ADP:



Acidul enolpiruvic se tautomerizează apoi spontan în forma sa cetonică:

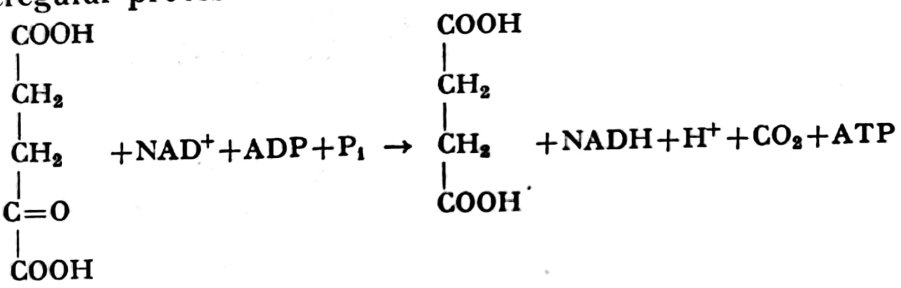


Ecuaţia globală a acestei fosforilări este următoarea:



3.3. SINTEZA DE ATP CUPLATĂ CU DECARBOXILAREA OXIDATIVĂ A ACIDULUI α-CETOGLUTARIC

Acidul α-cetoglutaric este un intermediar al ciclului acizilor tricarboxilici şi reacţia de transformare a sa în acid succinic implică o decarboxilare asociată cu oxidarea atomului de carbon vecin de la starea de carbonil la aceea de carboxil (decarboxilare oxidativă). Etapa oxidativă este puternic exergonică şi este cuplată cu sinteză de ATP. La această reacţie participă complexul enzimatic α-cetoglutarat dehidrogenaza, împreună cu diverse coenzime. Mecanismul acestei reacţii va fi descris mai departe. Ecuaţia globală a întregului proces este:



4. LANŢUL RESPIRATOR ŞI FOSFORILAREA OXIDATIVĂ

4.1. LANŢUL RESPIRATOR

Etapa finală a oxidărilor biologice constă în combinarea atomilor de hidrogen ai substratelor energetice, care au fost labilizaţi prin reacţii de dehidrogenare, cu oxigenul molecular:

$$2\,[H] + \frac{1}{2}O_2 \rightarrow H_2O$$

Dacă ţinem seama de faptul că atomii de hidrogen sînt legaţi de coenzime, această etapă poate fi reprezentată:

$$CoH_2 + \frac{1}{2}O_2 \rightarrow H_2O + Co_{ox}$$

Această interacţiune a hidrogenului cu oxigenul are loc de fapt în etape succesive prin care atomii de hidrogen, sau numai electronii acestora, sînt transportaţi pe sisteme redox cu afinităţi crescînde pentru echivalenţii reducători ca în final aceştia să fie acceptaţi de către molecula de oxigen. *Ansamblul sistemelor redox şi al enzimelor care participă la transferul echivalenţilor reducători (atomi de hidrogen sau electroni) de la coenzimele reduse pînă la oxigen, poartă denumirea de lanţ respirator sau lanţ transportor de electroni.*

Componenţii lanţului respirator, substanţele oxidoreducătoare, proteinele catalitice şi alţi factori auxiliari sînt cu toţii localizaţi în mitocondrii.

Aceste organite celulare se află în citoplasma tuturor celulelor aerobe. Ele au o organizare complexă care a fost elucidată prin microscopie electronică îmbinată cu cercetări biochimice. În fig. VIII.3 se arată schematic organizarea internă a unei mitocondrii hepatice. Mitocondriile sînt alcătuite din două membrane de natură lipoproteică. Membrana externă este netedă,

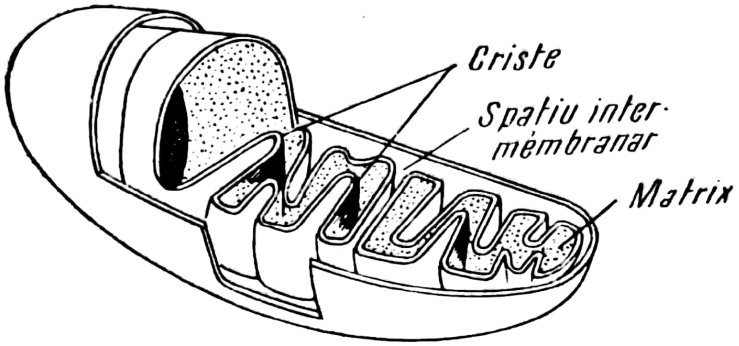


Fig. VIII.3. Schema unei mitocondrii hepatice.

pe cînd cea internă prezintă numeroase invaginații denumite criste. Spațiul interior delimitat de membrana internă poartă denumirea de matrix. Din membrana internă protuberează spre spațiul matriceal protuberanțe care cuprind proteinele implicate în sinteza de ATP (ATP sintetaza sau factorul 1 de cuplare, F_1). Prin plierea membranei interne se obțin suprafețe membranoase foarte întinse. Funcția de transport de electroni ca și fosforilarea cuplată cu acest transfer este localizată în membrana internă, iar numărul și dimensiunea cristelor mitocondriale variază de la țesut la țesut în raport cu intensitatea metabolismului oxidativ al acestora. Țesuturile care desfășoară un metabolism oxidativ intens, cum sînt mușchiul, rinichiul, au mitocondrii cu criste adînci și numeroase.

Studiul componenților lanțului transportor de electroni și dinamica acestora este mult îngreuiată de faptul că izolarea sub formă de componenți chimici puri presupune distrugerea arhitecturii mitocondriilor, aceștia fiind însăși elementele structurale ale membranelor. Pe de altă parte, diverșii componenți dislocați din membranele mitocondriale își pierd sau își alterează unele însușiri fizico-chimice pe care le prezintă in situ. Din aceste motive există multe lacune și impreciziuni cu privire la constituenții lanțului respirator. Componenții lanțului cel mai bine caracterizați din punct de vedere structural și funcțional sînt:

— NADH dehidrogenaza;

— Coenzima Q;

— Sistemul citocromilor alcătuit din citocromii a, b, c, c_1 și citocromoxidază (citocromul a_3).

NADH dehidrogenaza. Este o proteină catalitică care cuprinde ca grupare prostetică o moleculă de FMN (este o flavoproteină).

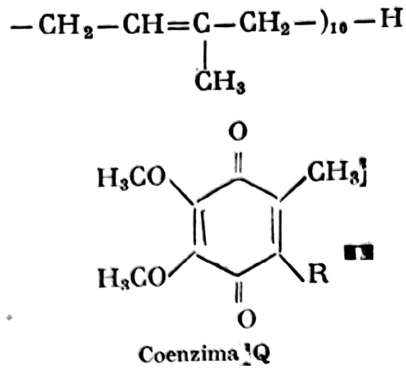
Reacția catalizată a NADH dehidrogenază (Enz.-FMN) constă în transferul echivalenților reducători (un electron și un atom de hidrogen) de la NADH pe un acceptor:

$$NADH + H^+ + Enz-FMN \rightarrow NAD^+ + Enz-FMNH_2$$

$$Enz-FMNH_2 + Acceptor \rightarrow Enz-FMN + Acceptor-H_2$$

Acceptorul natural al atomilor de hidrogen este coenzima Q, componentul adiacent din lanțul respirator.

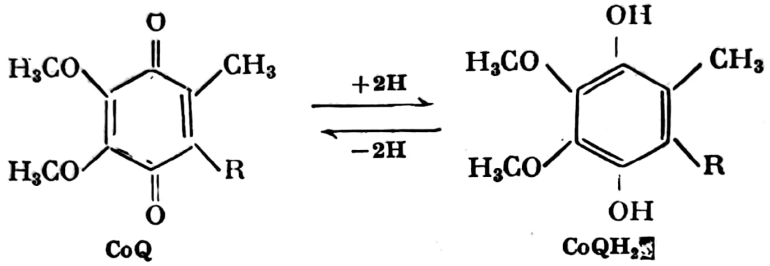
Coenzima Q. Acest compus are o greutate moleculară mică, este un derivat al 1,4-benzochinonei. Posedă o catenă hidrocarbonată (R) cu o structură izoprenică care la mamifere cuprinde 50 atomi de carbon:



Coenzima Q

Coenzima Q izolată din mitocondriile altor specii cuprinde o catenă cu 6 sau 9 unităţi izoprenice. Prezenţa acestui rest hidrocarbonat nepolar conferă substanţei liposolubilitate şi coenzima Q se află dizolvată în matricea lipoproteică a membranei mitocondriale interne.

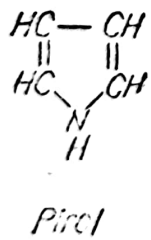
Coenzima Q prin structura sa chinoidă este aptă de a funcţiona ca aceeptor de hidrogen trecînd în forma sa redusă, difenolică:



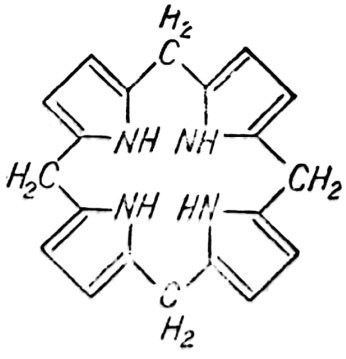
CoQ $\rightleftharpoons$ $CoQH_2$

În lanţul respirator coenzima Q mediază transferul de hidrogen între NADH dehidrogenază şi sistemul citocromilor prin oscilaţia sa între forma oxidată (CoQ) şi forma redusă ($CoQH_2$). De asemenea, coenzima Q acceptă atomi de hidrogen şi de la alte flavoproteine ca succinat dehidrogenază, acil-CoA dehidrogenază. Aceasta reprezintă o a doua cale de intrare în lanţul respirator a atomilor de hidrogen ai substratelor.

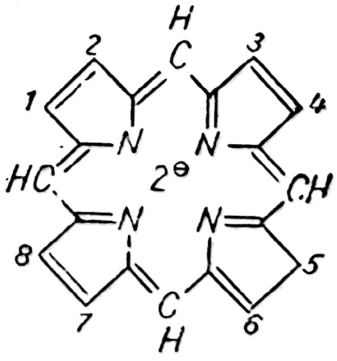
Sistemul citocromilor. Citocromii, substanţe înrudite cu hemoglobina şi mioglobina, fac parte din clasa hemoproteinelor. Hemoglobina şi mioglobina funcţionează ca transportori de oxigen iar citocromii ca transportori de electroni în lanţul respirator. Aceste proteine conjugate cuprind drept grupare protstetică un nucleu heterociclic complex — hemul. Grupările hem ale diverselor hemoproteine derivă dintr-un nucleu fundamental — porfinogen — format din patru nuclee pirolice reunite prin grupări metilenice. Din porfinogen, prin pierderea a şase atomi de hidrogen şi a doi protoni, se formează porfina:



Pirol



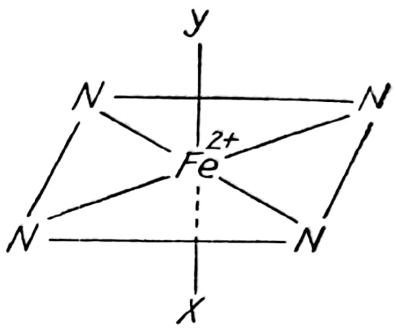
Porfinogen



Porfină

Prin substituirea atomilor de hidrogen din poziţiile 1—8 ale porfinei rezultă porfirine, substanţe deosebit de stabile, cu caracter aromatic şi care au o structură plană. Porfirinele au capacitatea de a complexa un ion de fier dînd naştere la hem, gruparea prostetică a hemoproteinelor. Ionul de fier este

legat de cei patru atomi de azot coplanari ai nucleului porfirinic şi de alţi doi liganzi externi (X şi Y) situaţi de o parte şi de alta a planului central.

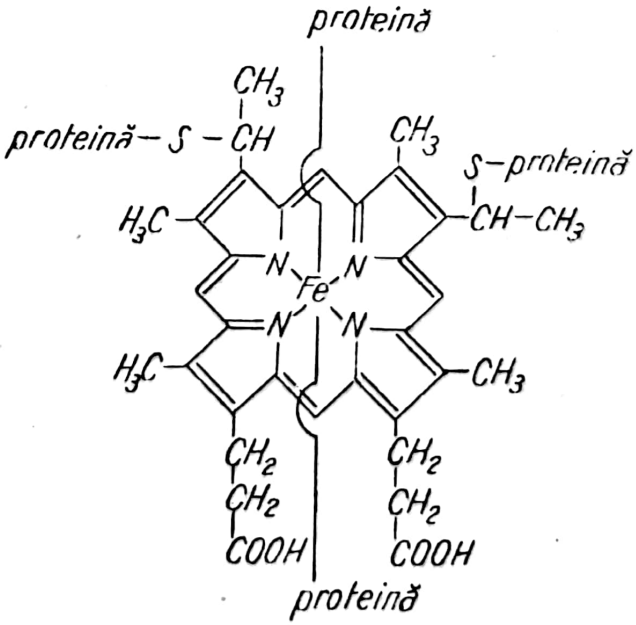


Diversele hemoproteine se deosebesc prin natura porfirinei, a porţiunii lor proteice sau numai prin modul de legare a metalului.

Porfirina din hemoglobină şi din mioglobină se numeşte protoporfirină şi cuprinde următorii substituenţi: metil în poziţiile 1, 3, 5, 8, vinil ($-CH=CH_2$) în poziţiile 2 şi 4 şi resturi de acid propionic ($-CH_2-CH_2-COOH$) în poziţiile 6 şi 7. Un ligand extern al fierului este un atom de azot dintr-un rest de histidină din lanţul polipeptidic iar cea de a şasea poziţie de coordinaţie a fierului este ocupată cu molecula de oxigen în forma oxigenată şi de o moleculă de apă în forma neoxigenată a hemoglobinei. Prin oscilaţia sa între cele două forme, hemoglobina îşi îndeplineşte funcţia de transportor de oxigen, funcţie ce nu comportă modificări ale valenţei fierului. În citocromi ambii liganzi externi sînt atomi aparţinînd lanţurilor polipeptidice, ei nu se mai pot combina cu oxigenul. Rolul citocromilor este acela de transport de electroni prin oscilaţia ionului de fier între valenţa 2^+ şi 3^+:

$$\text{cit } Fe^{2+} \underset{+e}{\overset{-e}{\rightleftharpoons}} \text{cit } Fe^{3+}$$

Citocromii din mitocondriile celulelor de mamifere sînt citocromii a, b, c şi c_1. Ei sînt înglobaţi în matricea lipoproteică a membranei interne a mitocondriilor şi obţinerea lor ca entităţi chimice distincte este foarte dificilă. De fapt, numai citocromul c a fost obţinut ca o proteină pură, omogenă. Hemul citocromului c diferă de acela al hemoglobinei prin natura substituenţilor din poziţiile 2 şi 4 prin care citocromul c se leagă cu partea proteică şi prin aceea că liganzii externi ai metalului sînt ambii atomi din partea proteică :



Structurile celorlalţi citocromi sînt mai puţin cunoscute decît ale citocromului c, dar comportarea lor generală este similară cu a acestuia din urmă.

Diverşii citocromi diferă între ei prin afinităţile pe care le au pentru electroni, prin potenţialele lor redox (Eo'). Din aceste motive ei interacţionează secvenţial, electronii, curgînd în sensul în care creşte afinitatea pentru electroni, a citocromilor, potenţialele redox devenind mai pozitive. Această secvenţă este următoarea:

$$\text{cit. b} \rightarrow \text{cit. } c_1 \rightarrow \text{cit. c} \rightarrow \text{cit. a}$$

Citocromul b interacţionează cu coenzima Q redusă. În această etapă atomii de hidrogen se disociază în electroni şi protoni. Protonii sînt eliberaţi în mediu iar electronii sînt acceptaţi de citocromul b care suferă reducere:

$$CoQH_2 + 2 \text{ cit. b}(Fe^{3+}) \rightarrow CoQ + 2 \text{ cit. b}(Fe)^{2+} + 2\,H^+$$

Urmează apoi transferul electronilor de la citocromul b la citocromul c_1 şi apoi succesiv la citocromii c şi a:

$$2 \text{ cit. b}(Fe^{2+}) + 2 \text{ cit. } c_1(Fe^{3+}) \rightarrow 2 \text{ cit. b}(Fe^{3+}) + 2 \text{ cit. } c_1(Fe^{2+})$$

$$2 \text{ cit. } c_1(Fe^{2+}) + 2 \text{ cit. c}(Fe^{3+}) \rightarrow 2 \text{ cit. } c_1(Fe^{3+}) + 2 \text{ cit. c}(Fe^{2+})$$

$$2 \text{ cit. c}(Fe^{2+}) + 2 \text{ cit. a}(Fe^{3+}) \rightarrow 2 \text{ cit. c}(Fe^{3+}) + 2 \text{ cit. a}(Fe^{2+})$$

Citocromul a redus, cu Fe^{2+}, este reoxidat prin interacţiunea sa cu ultimul sistem redox al lanţului respirator, citocrom-oxidaza sau citocromul a_3.

Citocrom-oxidaza (citocromul a_3). Această hemoproteină are o structură mult mai complexă decît a celorlalţi citocromi. Pe lîngă ionul de fier legat de grupările hem cuprinde şi ioni de cupru care mediază transferul de electroni de la forma redusă a citocromului a_3 la oxigen. Citocrom-oxidaza se află într-o strînsă asociaţie structurală şi funcţională cu citocromul a, încît aceşti doi componenţi nu au putut fi obţinuţi nici unul ca entităţi chimice distincte.

Prin funcţia sa, citocrom-oxidaza se deosebeşte fundamental de ceilalţi citocromi; ea acceptă electroni de la citocromul a redus pe care îi cedează apoi oxigenului molecular, reducîndu-l:

$$2 \text{ cit. a}(Fe^{2+}) + 2 \text{ cit. } a_3(Fe^{3+}) \rightarrow 2 \text{ cit. a}(Fe^{3+}) + 2 \text{ cit. } a_3(Fe^{2+})$$

$$2 \text{ cit. } a_3(Fe^{2+}) + \frac{1}{2} O_2 \rightarrow 2 \text{ cit. } a_3(Fe^{3+}) + O^{2-}$$

Oxigenul redus (O^{2-}) se combină instantaneu cu protonii din mediu:

$$O^{2-} + 2\,H^+ \rightarrow H_2O$$

Această reacţie încheie fluxul echivalenţilor reducători (atomi de hidrogen sau electroni) de la NADH la oxigen. Este ultima reacţie a lanţului respirator.

Prin interacţiunea sa cu oxigenul molecular, citocrom-oxidaza se aseamănă cu hemoglobina sau cu mioglobina. Totuşi se deosebesc prin aceea că atunci cînd hemoglobina sau mioglobina se oxigenează valenţa fierului nu se modifică, pe cînd în cazul citocrom-oxidazei interacţiunea sa cu oxigenul are loc prin transfer de electroni şi trecerea ionului de fier pe o treaptă superioară de oxidaţie. Citocrom-oxidaza se mai aseamănă cu hemoglobina şi cu

Scanned with OKEN Scanner

mioglobina prin sensibilitatea sa la acţiunea toxică a oxidului de carbon şi a cianurilor. Aceşti compuşi se pot lega de ionul central de fier împiedicîndu-l de a-şi exercita acţiunea sa oxidazică.

Ţinîndu-se seama de ordinea în care interacţionează diverşii săi componenţi, lanţul transportor de electroni poate fi redat aşa cum se arată în fig. VIII.4.

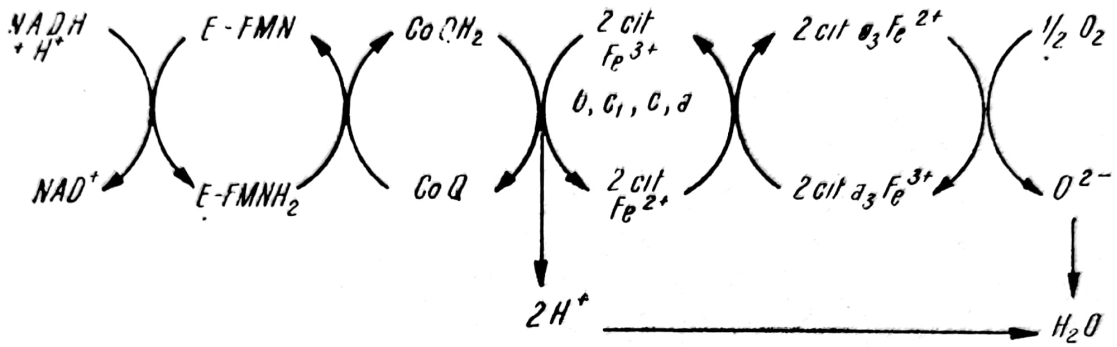


Fig. VIII.4. Lanţul transportor de electroni.

Fiecare component redox al lanţului suferă alternativ reduceri şi oxidări îndeplinind în acest fel un rol catalitic. Numai donorul de atomi de hidrogen şi acceptorul final se consumă.

Pentru înţelegerea funcţiei generale a lanţului respirator, reamintim că NADH-ul care alimentează lanţul cu electroni este generat în reacţiile de dehidrogenare a diverşilor metaboliţi. Dehidrogenazele care funcţionează cu NAD drept coenzimă acceptoare de hidrogen sînt foarte răspîndite în lumea vie. Există însă şi dehidrogenaze care funcţionează cu cealaltă coenzimă piridinică, NADP-ul, iar un alt grup de dehidrogenaze sînt asociate cu coenzimele flavinice, FMN sau FAD. NADPH-ul generat prin reacţiile de dehidrogenare nu interacţionează direct cu lanţul respirator. În principiu, atomii de hidrogen din NADPH pot fi transportaţi prin lanţul respirator pînă la oxigen numai după ce au fost transferaţi pe NAD^+, prin următoarea reacţie de transhidrogenare:

$$NADPH + NAD^+ \rightarrow NADP^+ + NADH$$

Reacţia are o importanţă redusă în economia organismului; funcţia biologică majoră a atomilor de hidrogen din molecula de NADPH fiind aceea de a furniza agenţi reducători în reacţiile de biosinteză.

Atomii de hidrogen ai substratelor care suferă dehidrogenări mediate de flavoproteine pătrund în lanţul respirator la nivelul coenzimei Q, care acceptă hidrogen atît de la NADH dehidrogenază, flavoproteină cu FMN, cît şi de la alte flavoproteine asociate fie cu FAD fie cu FMN. Dacă se iau în consideraţie cele două căi de pătrundere a echivalenţilor reducători, lanţul respirator poate fi reprezentat aşa cum se arată în fig. VIII.5.

Energetica lanţului respirator. Oxidarea NADH-ului în lanţul respirator este un proces puternic exergonic; din căderea de potenţial de 1,14 v între termenii extremi, NADH şi oxigenul molecular, se calculează o variaţie de energie liberă de —52,6 Kcal. Această energie este eliberată în pachete mai mari sau mai mici, pe măsură ce electronii trec de la un sistem redox la altul

cu putere oxidantă mai mare. O parte din energia liberă ce devine disponibilă prin curgerea electronilor în lungul gradientului de potenţial este utilizată pentru sinteză de ATP.

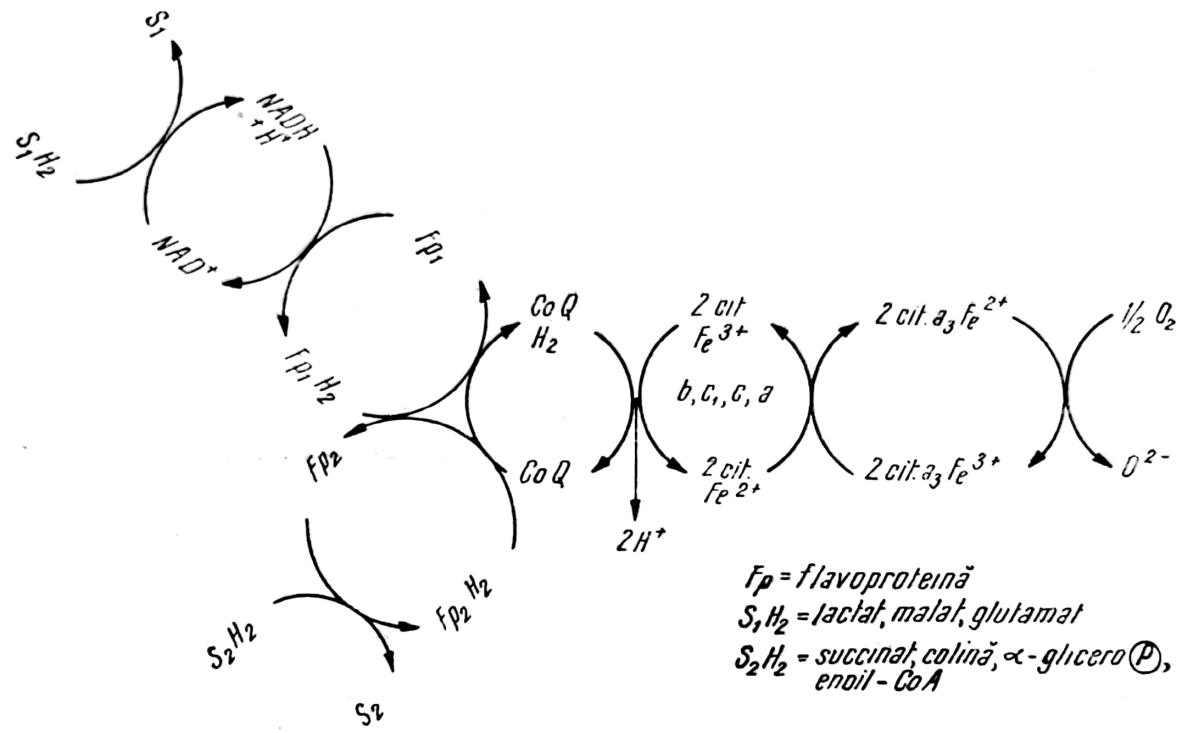


Fig. VIII.5. Alimentarea lanţului respirator cu hidrogen.

4.2. FOSFORILAREA OXIDATIVĂ CUPLATĂ CU LANŢUL RESPIRATOR

Sinteza de ATP, din ADP şi fosfat anorganic, pe seama energiei eliberate de oxidarea hidrogenului în lanţul respirator, se numeşte fosforilare oxidativă cuplată cu lanţul respirator. Din punct de vedere structural, enzimele şi toţi factorii auxiliari procesului de cuplare a celor două reacţii se află în vecinătatea imediată a lanţului respirator, sînt şi ei elemente componente ale membranei interne a mitocondriilor. Funcţionarea eficientă a mecanismului fosforilant necesită integritatea structurală a mitocondriilor şi a membranelor lor interne. Diverşii factori catalitici, substratele şi cofactorii se află în relaţii spaţiale reciproce, bine determinate. Din aceste motive, cercetarea fosforilării oxidative, analiza sa chimică, cinetică, termodinamică, este deosebit de dificilă şi cunoştinţele în această privinţă prezintă încă multe lacune.

Căderea de energie liberă la transportul unei perechi de atomi de hidrogen prin lanţul respirator, de 52,6 Kcal, este inegal repartizată pentru diversele cupluri redox. Cantităţile cele mai mari de energie sînt mobilizate la transferul echivalenţilor reducători de la NADH la coenzima Q (12,2 Kcal), de la citocromul b la citocromul c (9,9 Kcal) şi o a treia cădere mare de energie liberă are loc în segmentul lanţului respirator cuprins între citocromul a şi acceptorul final, oxigenul (23,8 Kcal). Aceste căderi de energie liberă sînt suficient de mari pentru a permite fosforilarea endergonică a ADP-ului. Într-adevăr, prin diverse metode s-a stabilit că oxidarea unei molecule de NADH în lanţul respirator este cuplată cu sinteza a trei molecule de ATP.

Scanned with OKEN Scanner

De asemenea, s-a dovedit, prin experienţe directe, că segmentele din lanţul respirator unde procesul oxido-reducător este cuplat cu sinteză de ATP sînt tocmai acelea deduse din mărimea variaţiilor de energie liberă. Prin urmare, lanţul respirator cuprinde trei puncte de fosforilare, trei puncte de cuplare a celor două procese, cel oxidativ şi cel fosforilant (fig. VIII.6). Dacă ţinem

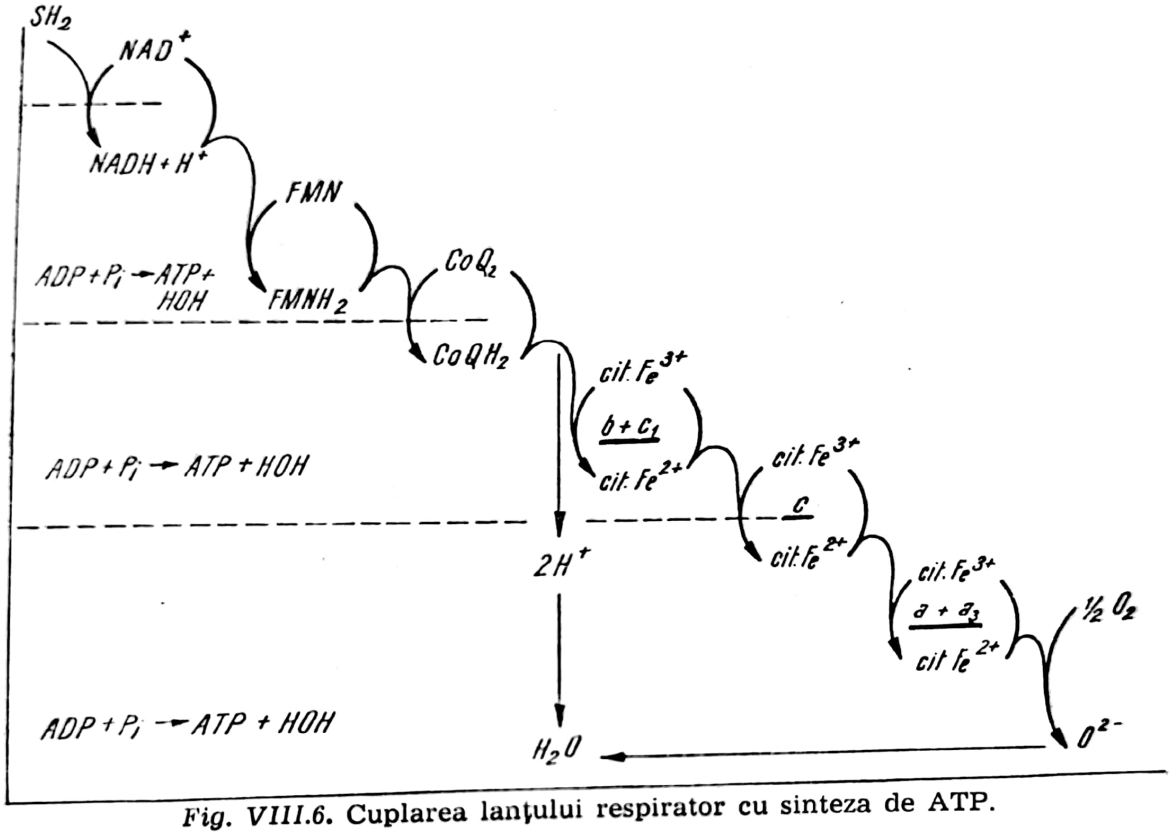


Fig. VIII.6. Cuplarea lanţului respirator cu sinteza de ATP.

seama de cuplarea transportului de electroni cu sinteza de ATP, ecuaţia stoichiometrică globală de funcţionare a lanţului respirator este următoarea:

$$NADH + H^+ + \frac{1}{2} O_2 + 3ADP + 3\,H_3PO_4 \rightarrow NAD^+ + 3\,ATP + 4H_2O$$

Această ecuaţie arată că oxidarea unei molecule de NADH prin consumarea unui atom de oxigen molecular este asociată cu sinteza a trei molecule de ATP şi denotă funcţionarea procesului cu o eficienţă foarte ridicată. Luîndu-se în consideraţie componenta exergonică (—52,6 Kcal) şi cea endergonică ($3 \times 7{,}3 = 21{,}9$ Kcal) rezultă că randamentul de utilizare a energiei mobilizate în lanţul respirator este de 43%, o valoare foarte ridicată în comparaţie cu randamentele de funcţionare a maşinilor. Eficienţa actuală cu care funcţionează lanţul respirator şi fosforilarea cuplată într-un preparat biologic dat, se poate stabili experimental prin măsurarea simultană a cantităţii de ATP sintetizat şi de oxigen consumat. Întrucît măsurătorile de ATP sînt mai laborioase, pentru a obţine cantitatea de ATP sintetizată se măsoară concentraţia fosfatului anorganic în preparat la începutul şi la sfîrşitul determinării iar diferenţa dintre valoarea iniţială şi cea finală reprezintă cantitatea de fosfat anorganic care a fost legat de ADP. Raportul dintre cantitatea de fosfat legat (exprimată în molecule gram) şi cea de oxigen consumat (exprimată în atomi gram) de către un preparat mitocondrial, sau de către un ţesut se

Scanned with OKEN Scanner

numește cît de fosforilare $\Delta P_i/\Delta O_2$ sau P/O. Valoarea acestui raport exprimă gradul de cuplare dintre fosforilare și procesul oxidativ consumator de oxigen (respirație). La oxidarea NADH-ului raportul P/O are valoarea 3. În cazul în care atomii de hidrogen ai unui metabolit sînt introduși în lanțul respirator la nivelul coenzimei Q, prin intermediul unei coenzime flavinice (FMN sau FAD), electronii acestora parcurg numai două puncte de fosforilare. Oxidarea unei molecule de $FADH_2$ sau de $FMNH_2$ este cuplată cu sinteza a două molecule de ATP, raportul de fosforilare P/O are valoarea 2.

4.2.1. MECANISMUL FOSFORILĂRII OXIDATIVE

Mecanismul molecular prin care sînt cuplate procesul oxidativ și fosforilarea ADP-ului este puțin cunoscut în ciuda multor eforturi depuse de numeroși cercetători. Factorul care îngreuiază cel mai mult studiul fosforilării oxidative este deteriorarea rapidă a mecanismelor care leagă cele două procese. Pe lîngă componenții redox ai lanțului respirator, la procesul de fosforilare participă o serie de factori auxiliari, imperfect caracterizați, denumiți factori de cuplare. Aceștia îndeplinesc fie roluri enzimatice (sînt proteine catalitice) fie sînt proteine structurale care iau parte la asamblarea corectă a diverșilor componenți activi și asigură funcționalitatea sistemului.

Prima ipoteză cu privire la mecanismul fosforilării oxidative, cunoscută ca ipoteza cuplării chimice (Slater 1953), prin analogie cu mecanismul sintezei de ATP cuplată cu oxidarea gliceraldehidei-3-fosfat (o fosforilare de substrat), admite că energia mobilizată în reacția redox dintre doi componenți ai lanțului respirator de la un punct de cuplare (AH_2 și B) este conservată într-un compus cu potențial chimic ridicat, $A\sim X$, unde X este un factor auxiliar prezent în mitocondrii. Legătura macroergică $A\sim X$ este transferată în intermediarii $X\sim Y$, $Y\sim P$ și în final în molecula de ATP:

$$AH_2+B+X \rightleftharpoons A\sim X+BH_2$$
$$A\sim X+Y \rightleftharpoons A+X\sim Y$$
$$X\sim Y+P_i \rightleftharpoons Y\sim P+X$$
$$Y\sim P+ADP \rightleftharpoons ATP+Y$$

Compușii X și Y sînt factori ipotetici a căror existență nu a putut fi însă dovedită. Cu toate că această ipoteză de cuplare chimică dintre reacțiile redox și sinteza de ATP nu a fost confirmată de datele experimentale, intermediarii macroergici, $A\sim X$, $X\sim Y$ și $Y\sim P$ nu au fost identificați, totuși ea își păstrează încă valoarea unei ipoteze de lucru, permițînd explicarea multor însușiri ale modului de funcționare și de control ale lanțului respirator mitocondrial.

Ipoteza conformațională a fosforilării oxidative susține că energia mobilizată de fluxul electronic prin lanțul respirator este conservată primar într-o conformație labilă, energizată, a proteinelor de cuplare. Revenirea la starea săracă în energie este forța care determină sinteza de ATP:

$$AH_2+B+X \rightleftharpoons A+BH_2+X^*$$
$$X^*+ADP+P_i \rightleftharpoons X+ATP+H_2O$$

Această ipoteză este sprijinită de multiple observații electrono-optice care atestă modificări în conformația mitocondriilor corelative funcționării lanțului respirator. Trecerea mitocondriilor din stare de repaus metabolic în stare activă, în care se consumă oxigen și se sintetizează ATP, este asociată cu

Scanned with OKEN Scanner

plisarea membranei interne și adîncirea cristelor, volumul matriceal reducîndu-se sub 50% (conformație condensată a mitocondriilor, Hackenbrock).

O a treia ipoteză a cuplării fosforilării oxidative, ipoteza chemiosmotică (Mitchell, 1961) postulează că factorul care promovează sinteza de ATP din ADP și P_i este un gradient de protoni generat de reacțiile redox din lanțul

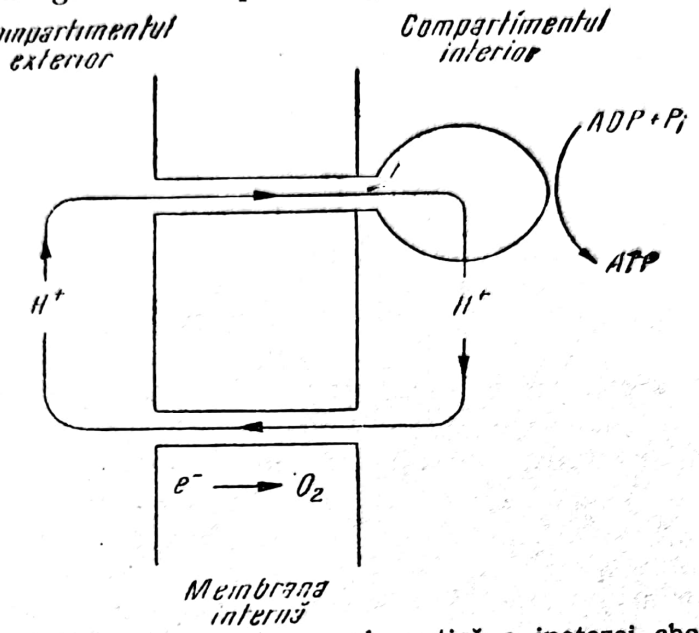


Fig. VIII.7. Reprezentarea schematică a ipotezei chemiosmotice a fosforilării oxidative.

respirator. Această ipoteză, de o valoare teoretică și practică deosebită, introduce concepțiile de forță protonomotrice și de proticitate analoage acelora de forță electromotrice și de electricitate.

Cuplarea chemiosmotică a lanțului de reacții redox cu sinteza de ATP se bazează pe următoarele postulate:

a) Componenții redox ai lanțului respirator ocupă poziții relativ rigide în membrana internă a mitocondriilor, membrană impermeabilă pentru protoni și pentru ionii HO^-.

b) Funcționarea lanțului respirator, curgerea electronilor de la NADH la oxigen, translocă protoni din compartimentul matriceal al mitocondriei pe partea exterioară a membranei interne generînd un gradient de protoni, o diferență de pH între cele două fețe ale membranei.

c) Sinteza de ATP este catalizată de o enzimă, ATP-sintetază, localizată în membrana internă. De fapt, ATP-sintetaza sau factorul 1 de cuplare, F_1, este localizată în protuberanțele membranei interne. Reacția $ADP+P_i \rightarrow ATP+H_2O$ este o deshidratare și elementele apei, ionii H^+ și HO^- sînt eliberați pe cele două fețe ale membranei. Protonii sînt eliberați în spațiul matriceal, iar ionii HO^- spre exterior:

$$ADP+P_i \rightleftharpoons ATP+H^+_{interior}+HO^-_{exterior}$$

d) Gradientul de protoni generat de lanțul respirator, opus aceluia al ATP-sintetazei, favorizează deshidratarea ADP-ului și fosfatului cu formare de ATP.

Prin urmare, cuplarea lanțului respirator cu sinteza de ATP are loc printr-un curent de protoni, printr-o forță protonomotrice generată de reacțiile redox (fig. VIII. 7).

Scanned with OKEN Scanner

Integritatea mitocondriilor, a membranei interne este o condiție esențială pentru cuplarea reacțiilor redox cu sinteza de ATP. Lezarea membranei interne, a membranei de cuplare, anulează gradientul de concentrație ionică transversal membranei, scurt-circuitează curentul de protoni.

Conceptul lui Mitchell de transfer de energie prin curent de protoni (proticitate) se aplică și la alte fenomene, fotosinteză, transportul ionilor și al substratelor prin membrane, deschizînd noi perspective de explicare a proceselor biologice energodependente.

4.2.2. CONTROLUL RESPIRATOR

Reacțiile oxidative din organismele vii au ca ultim scop asigurarea unei surse de energie chimică utilizabilă pentru efectuarea de travalii. Ritmul în care se desfășoară aceste procese oxidative este reglat potrivit nevoilor generale sau locale ale organismului. Celulele dispun de multiple mecanisme de control a activității catabolice, mobilizatoare de energie, dar factorul regulator cel mai economic este acela care limitează debitul de electroni prin lanțul respirator și consumul de oxigen. Ecuația stoichiometrică care redă activitatea globală a lanțului respirator:

$$NADH + H^+ + \frac{1}{2} O_2 + 3\,ADP + 3\,P_i \rightarrow NAD^+ + 4H_2O + 3ATP$$

arată care sînt substanțele ce iau parte la acest proces și care se consumă în cursul funcționării lanțului respirator: oxigen, ADP, fosfat anorganic și NADH. NADH-ul se formează prin dehidrogenarea substratelor și de fapt acestea sînt cele care se consumă efectiv, coenzima avînd doar rolul de cărăuș al echivalenților reducători între substrat și lanțul respirator. Avîndu-se în vedere că procesul oxidativ este cuplat funcțional cu fosforilarea ADP-ului, rezultă că prezența tuturor celor patru substanțe: oxigen, ADP, P_i și substratul generator de echivalenți reducători este indispensabilă pentru funcționarea lanțului respirator. În principiu, concentrația fiecăruia dintre acești reactanți poate limita debitul echivalenților reducători prin lanțul respirator, intensitatea respirației celulare. Deoarece afinitatea lanțului respirator pentru acești compuși este diferită și capacitatea lor de factori reglatori este de asemenea diferită.

În celule substratele oxidabile primare — glucoză, acizi grași sau aminoacizi — și metaboliții intermediari sînt prezenți în orice moment în concentrații destul de mari. Totuși, vitezele cu care sînt oxidate substratele în diverse țesuturi nu sînt egale și nu depind de concentrațiile lor, ceea ce înseamnă că nivelul intracelular al substratelor în mod normal nu este un factor limitativ pentru funcționarea lanțului respirator. De asemenea, oxigenul în condiții obișnuite este prezent în țesuturi în cantitate suficientă pentru a asigura oxidarea rapidă a hidrogenului substratelor. Oxigenarea insuficientă a unui țesut — hipoxia sau anoxia — sînt situații excepționale deosebit de grave, care pun în pericol existența organismului. Însă în mod normal celulele sînt bine aprovizionate cu oxigen și concentrația sa nu este un factor limitativ.

Compusul a cărei concentrație controlează viteza de curgere a electronilor prin lanțul respirator, deci oxidarea substratelor energogene este ADP-ul. Întrucît acest nucleotid intervine în fosforilarea oxidativă ca acceptor al resturilor fosforil cu potențial chimic ridicat (~P), *reglarea oxidărilor prin*

Scanned with OKEN Scanner

lanțul respirator de către concentrația ADP-ului este denumită reglare prin acceptor de fosfat sau control respirator prin acceptor de fosfat. Dacă celula dispune de concentrații potrivite de acceptor de fosfat macroergic, ea va oxida substratele energogene într-un ritm rapid. AMP-ul poate funcționa și el ca un acceptor de fosfat macroergic prin intermediul reacției catalizate de miokinază:

$$AMP + ATP \rightleftharpoons 2\,ADP$$

și din această cauză și concentrațiile ridicate de AMP stimulează fluxul de electroni prin lanțul respirator.

Controlul respirator prin acceptor de fosfat se explică prin cuplarea strînsă a transferului de electroni și a sintezei de ATP. Dacă se examinează schema mecanismului fosforilării oxidative, se observă că reacția de oxidare dintre cei doi componenți ai lanțului respirator (A și B) are loc în prezența factorului de cuplare I. Acesta este prezent în mitocondrii în cantități limitate și în absența ADP-ului el va rămîne blocat sub forma sa energizată ($\sim$I). În absența intermediarului I curentul de electroni prin lanțul respirator este întrerupt, oxidarea este inhibată din lipsa acceptorului de fosfat.

După ipoteza cuplării chemiosmotice controlul respirator, sistarea transportului de electroni în absența sintezei de ATP, se explică prin presiunea inversă exercitată de gradientul de protoni asupra reacțiilor redox. Dacă gradientul de protoni este prea ridicat, fluxul protonic prin ATP-sintetază nu poate avea loc din lipsă de ADP, transferul de electroni care generează proticitatea este inhibat.

Controlul respirator prin acceptor de fosfat este o însușire a lanțului respirator cu implicații profunde pentru energetica celulelor și a organismului întreg. Acest fenomen arată că substratele energogene celulare nu sînt oxidate decît în măsura în care există un debușeu pentru energia mobilizată prin oxidarea lor. Celulele care desfășoară activități intense consumă ATP într-un ritm rapid și regenerează continuu ADP, acceptorul de fosfat macroergic care stimulează fluxul de electroni prin lanțul respirator. Din contră, dacă nevoile energetice ale unei celule sînt momentan reduse, ATP-ul este consumat cu viteză mică și nivelul ADP-ului este coborît. În consecință, viteza de oxidare a substratelor este diminuată, este pusă în acord cu nevoile de energie ale celulei.

Pentru înțelegerea importanței acestui mecanism de control al oxidărilor celulare, este util de subliniat că ATP-ul nu joacă rolul unui depozit, al unui rezervor de energie. El este numai un transportor al energiei substratelor reduse, bogate în energie chimică potențială, spre procesele endergonice. Concentrația intracelulară totală a celor trei nucleotide cu adenină: ATP, ADP și AMP este cuprinsă între 1—10 mM. Atunci cînd sistemul adenin-nucleotizilor este saturat cu fosfat macroergic, concentrația ATP-ului este maximă, rezerva de energie celulară este totuși redusă. De exemplu, rezervele de energie ale mușchilor scheletici sub formă de ATP și de alți compuși fosforilați macroergici pot asigura activitatea țesutului numai pentru cîteva secunde. ATP-ul este furnizor imediat de energie pentru desfășurarea diverselor activități celulare dar el este sintetizat ad hoc prin fosforilări cuplate fie cu oxidarea unor substrate reduse, fie prin fosforilări cuplate cu transportul electronilor prin lanțul respirator.

Scanned with OKEN Scanner

Scanned with OKEN Scanner

4.2.3. DECUPLAREA RESPIRAȚIEI DE FOSFORILARE

Așa cum s-a arătat mai înainte, inhibiția fluxului de electroni prin lanțul respirator dacă procesul nu este cuplat cu fosforilarea ADP-ului, se explică prin blocarea factorilor de cuplare (I și E) în formele lor energizate (~I și ~E). Totuși, dacă prin reacții secundare, de exemplu prin hidroliză, intermediarii macroergici ai fosforilării oxidative A~I, I~E, E~P sînt scindați și factorii de cuplare sînt puși în libertate, atunci electronii pot circula prin lanțul respirator în absență de ADP și respectiv, fără a mai avea loc sinteza de ADP. Această situație în care transportul de electroni prin lanțul respirator, respectiv oxidarea substratelor energogene, are are loc fără sinteză de ATP se numește respirație decuplată. Mecanismele care leagă funcțional transportul de electroni prin lanțul respirator sînt deteriorate, energia mobilizată în procesele de oxidare se risipește integral în mediul înconjurător sub formă de căldură. Prin decuplarea respirației de fosforilare controlul respirator prin ADP este abolit. Substanțele sînt oxidate rapid fără a mai fi necesară prezența acceptorului de fosfat macroergic.

Potrivit ipotezei chemiosmotice a lui Mitchell decuplarea reacțiilor redox ale lanțului respirator de sinteza de ATP se explică prin anularea gradientului de protoni transversal membranei interne. Deteriorarea membranei sau adăugarea de substanțe (agenți decuplanți) apte să transporte protonii sau ionii hidroxil prin membrana de cuplare determină disjuncția dintre respirație și sinteza de ATP, abolește controlul respirator.

În vitro decuplarea oxidărilor prin lanțul respirator de fosforilarea ADP-ului se poate realiza prin adăugarea la preparatele mitocondriale a diverși compuși chimici denumiți agenți decuplanți. De asemenea, dacă preparatele mitocondriale sînt supuse unor tratamente mai drastice, cum ar fi agitarea mecanică puternică, păstrare la temperaturi de 20—30°, expunere la medii hipoosmotice, mecanismul fosforilant este deteriorat și se produce disjuncția respirației de sinteză de ATP. Probabil că in vivo mulți factori endogeni acționează prin decuplarea fosforilării oxidative, diminuîndu-se în acest fel eficiența proceselor oxidative.

La anumite specii există o varietate de țesut gras — țesutul adipos brun — care posedă un sistem oxidativ ce funcționează decuplat de sinteză de ATP și care are roluri importante în termoreglare. Țesutul adipos brun își datorează culoarea mai închisă conținutului său mai ridicat în mitocondrii și respectiv în citocromi (pigmenți respiratori). Această varietate de țesut adipos este abundent la făt și la nou-născut și se află distribuit în genere în lungul vaselor mari și în regiunea omoplaților. La adult cantitățile de țesut adipos brun sînt mici și cu variații individuale. Animalele în hibernare cuprind cantități mari din acest țesut.

Lanțul respirator din mitocondriile țesutului adipos brun funcționează fără a fi strîns cuplate cu fosforilarea ADP-ului. Cîturile de fosforilare (P/O) pentru mitocondriile din țesutul adipos brun sînt mai mici decît 3 atunci cînd oxidează un substrat care generează NADH, sau sînt mai mici decît 2 pentru un substrat generator de $FADH_2$ sau de $FMNH_2$. Controlul respirator prin acceptor de fosfat este foarte scăzut sau chiar nul. Transportul de electroni spre oxigen nu necesită prezența ADP-ului, el nefiind cuplat cu sinteză de ATP. Energia eliberată în reacțiile de oxidare din lanțul respirator se risipește în mediu sub formă de căldură.

5. OXIDAZELE CU FUNCȚIE MIXTĂ

În reticulul endoplasmatic din ficat și din alte țesuturi funcționează un lanț transportor de electroni care activează oxigenul molecular în vederea încorporării lui în diverși compuși (oxigenază). Acest sistem oxigenazic funcționează ca o dioxigenază sau monoxigenază după cum unul sau ambii atomi ai moleculei de oxigen sînt introduși în molecula substratului. Reacția de monoxigenare este mult mai răspîndită decît cealaltă și ea corespunde, în cele mai multe cazuri, unei hidroxilări. Sistemul enzimatic implicat în astfel de reacții este denumit oxidază cu funcție mixtă. Stoichiometria reacției este redată prin ecuația:

$$R-H+O_2+NADPH+H^+ \rightarrow ROH+NADP^+ +H_2O$$

care arată că un atom din molecula O_2 formează gruparea hidroxilică iar cel de al doilea împreună cu doi echivalenți reducători furnizați de NADPH (sau NADH) formează apă.

Oxidaza cu funcție mixtă este foarte abundentă în reticulul endoplasmatic (microsomi) din ficat participînd la multiple reacții anabolice și catabolice. De asemenea, participă și la reacțiile de metabolizare a multor substanțe străine pătrunse în organism ca medicamente sau ca poluanți chimici și din aceste motive este cunoscut ca sistemul oxidazic microsomal de metabolizare a medicamentelor. Reticulul endoplasmatic și mitocondriile din cortexul adrenalelor, din ovar și testicul cuprind un sistem oxidazic cu funcție mixtă similar celui din ficat.

Componentul specific al oxidazei cu funcție mixtă este citocromul P-450, activator al oxigenului molecular. Acest citocrom formează cu oxidul de carbon un complex al cărui maxim de absorbție de la 450 nm îl deosebește de citocromii lanțului respirator mitocondrial. Citocromul P-450 înglobat în matricea lipoproteică a reticulului endoplasmatic nu a fost obținut încă sub forma unei proteine omogene. Funcțional, citocromul P-450 se aseamănă cu citocrom oxidaza lanțului respirator, se combină cu oxigenul molecular (și cu CO), ceea ce indică disponibilitatea unei poziții de coordinație a fierului central și acceptă electroni de la transportorii adiacenți care îi reduc valența ionului de fier. Un ciclu catalitic de hidroxilare a unui substrat (RH) consumă doi electroni (furnizați de NADPH sau de NADH) și o moleculă de oxigen. În fig. VIII.8 se arată mecanismul de hidroxilare prin intermediul citocromului P-450. Transportul echivalenților reducători de la coenzima piridinică redusă la citocromul P-450 este mediat de o flavoproteină (sau mai multe) la nivelul căreia are loc disjuncția hidrogenului în electroni care sînt acceptați de citocromul P-450 și în protoni care în ultima etapă a ciclului catalitic formează apa cu oxigenul redus. Citocromul P-450 acceptă cei doi electroni în două etape separate de intervenția oxigenului. În cursul acestui ciclu catalitic se formează ionul superoxid, O_2^-, formă activată a oxigenului. Transportul celor doi electroni de la NADPH la O_2, via citocromul P-450, mobilizează o cantitate considerabilă de energie dar ea este utilizată numai pentru a acoperi efectul energetic pozitiv al reacției de hidroxilare. Se estimează că formarea unei grupări hidroxil are o valoare $\Delta G^{o'}$ de aproximativ +40 Kcal. Lanțul transportor de electroni al oxidazei microsomiale nu este cuplat cu sinteză de ATP.

Scanned with OKEN Scanner

Sistemul hidroxilant hepatic, dependent de citocromul P-450, participă la metabolismul unei varietăţi mari de compuşi. Printre cele mai importante sînt reacţiile de hidroxilare din secvenţa de biosinteză a colesterolului, transformarea colesterolului în acizi biliari, degradarea hemului la bilirubină. Catabolismul hormonilor steroidici — sexuali şi corticosuprarenalieni — are loc

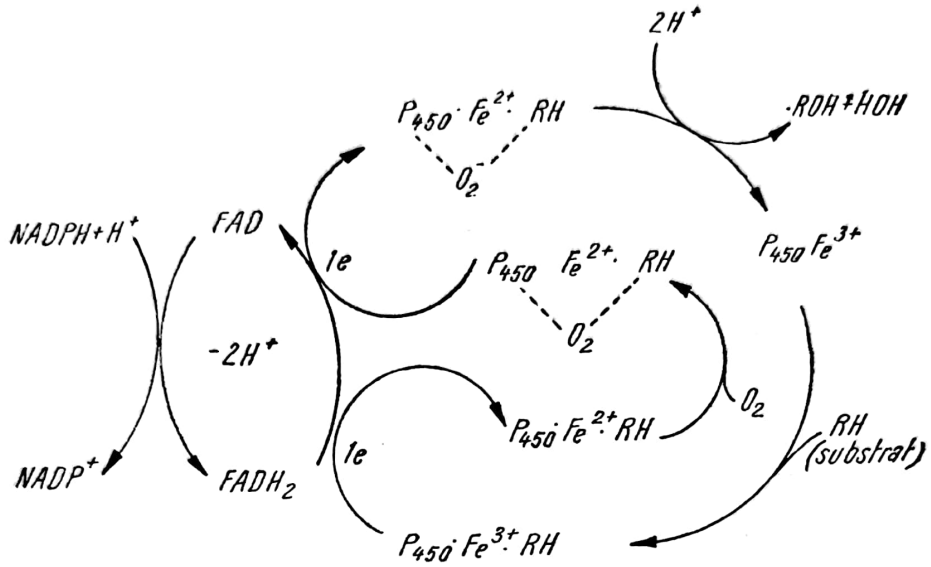


Fig. VIII.8. Mecanismul hidroxilării dependente de citocromul P-450.

în majoritate în ficat prin reacţii de hidroxilare, astfel încît durata lor de acţiune este reglată prin activitatea sistemului oxidazic cu funcţie mixtă. Activitatea acestui sistem este dependentă de factori legaţi de sex, de vîrstă, de starea de nutriţie. Participarea oxidazei cu funcţie mixtă la metabolismul compuşilor endogeni a fost întrucîtva umbrită prin implicarea acestui sistem la detoxifierea medicamentelor, a pesticidelor, a hidrocarburilor cancerigene. Activitatea de bază a sistemului hidroxilant este relativ joasă dar este stimulată considerabil după administrarea unor substanţe străine, medicamente sau de alt fel. Aceştia acţionează ca inductori determinînd o accelerare a sintezei de proteine din reticulul endoplasmatic în general şi a citocromului P-450 în special. Luminalul (fenobarbital), medicament din clasa barbituricelor, este unul din cei mai activi inductori şi este utilizat curent în studii de inducţie a sistemului de metabolizare a drogurilor. Administrarea fenobarbitalului la şobolani (75 mg/kilocorp) a determinat creşteri de 20—30% a proteinelor hepatice şi activări de 10—14 ori ale sistemului hidroxilant. Dacă se ia în consideraţie varietatea foarte mare de droguri ce acţionează ca inductori, este puţin probabilă o interacţiune directă a lor cu aparatul genetic celular. Se crede că inducţia este mediată de o substanţă fiziologică al cărei metabolism este influenţat de inductor. Hormonii steroidici, substrate naturale ale sistemului oxidazic hidroxilant, par a fi aceşti compuşi pentru care H. Selye propune denumirea de hormoni catatoxici. Rolul biologic al oxidazelor cu funcţie mixtă este acela de a debarasa organismul de cantităţile anormal de ridicate ale unor substanţe active, fie ele normale (hormoni) sau străine. Această funcţie este mai puţin evidentă la concentraţiii apropiate de cele fiziologice dar se amplifică în faţa unei agresiuni medicamentoase.

Scanned with OKEN Scanner

Capitolul IX

METABOLISMUL GLUCIDELOR

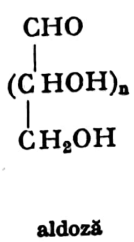
1. CHIMIA GLUCIDELOR

Glucidele (hidraţi de carbon sau zaharuri) sînt substanţe foarte răspîndite în lumea vie, mai ales în regnul vegetal unde sînt obţinute prin fotosinteză. Organismele animale cuprind cantităţi mici de glucide; în schimb, mai mult de jumătate din conţinutul caloric al raţiilor alimentare ale omului este asigurat de substanţele glucidice.

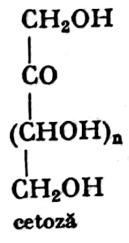
Glucidele se împart în monozaharide — substanţele fundamentale ale acestei clase — oligozaharide şi polizaharide — produşi de condensare ai primelor.

1.1. MONOZAHARIDELE

Monozaharidele sau ozele sînt alcooli-aldehide (aldoze) sau alcooli-cetone (cetoze). Numărul de atomi de carbon, egal cu numărul de atomi de oxigen, este cuprins între trei şi şapte. La anumite specii de plante se află şi monozaharide cu un număr mai mare de atomi de carbon. Formulele generale de constituţie ale aldozelor şi ale cetozelor sînt:



aldoză



cetoză

1.1.1. STEREOIZOMERIA MONOZAHARIDELOR

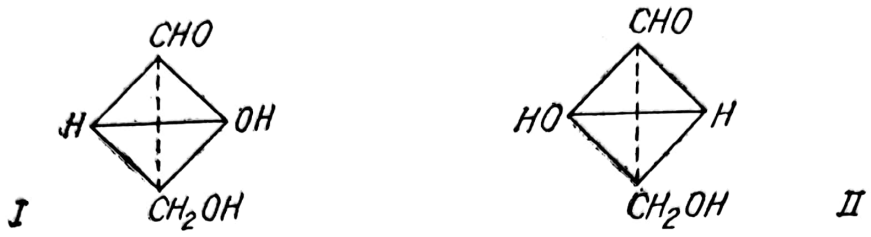
Moleculele monozaharidelor, cu excepţia cetotriozei, cuprind unul sau mai mulţi atomi de carbon asimetrici, fapt pentru care prezintă activitate optică şi o multitudine de forme stereoizomere. Aldotrioza ($CHO-CHOH-CH_2OH$, gliceraldehida) cuprinde un singur carbon asimetric şi există sub forma a doi izomeri configuraţionali care diferă numai prin sensul în care rotesc planul de polarizare a luminii (enantiomeri, antipozi optici). Formulele acestor izomeri sînt scrise potrivit unor convenţii ce urmează a fi riguros respectate ca moleculele să-şi păstreze identitatea:

— Tetraedrul atomului de carbon asimetric este situat cu o muchie în planul hîrtiei (linie punctată) şi cu celelalte deasupra acestui plan (linii pline). Muchiile tetraedului sînt de lungimi egale.

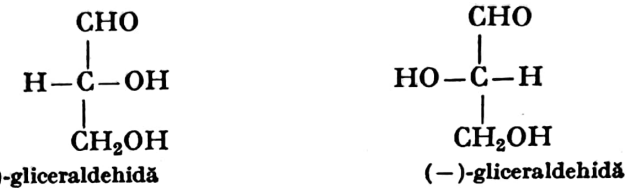
Scanned with OKEN Scanner

— Gruparea carbonilică și cea alcoolică primară sînt legate în colțurile de sus și respectiv de jos ale tetraedului carbonului asimetric. Atomul de hidrogen și gruparea alcoolică secundară sînt situate în colțurile din dreapta și din stînga.

Configurațiile celor doi enantiomeri ai gliceraldehidei sînt:



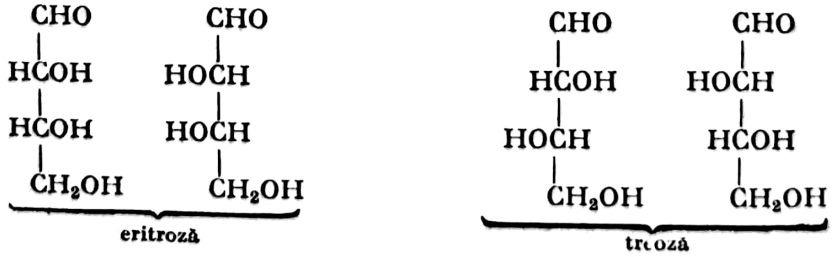
Convențional, configurația I a fost atribuită izomerului dextrogir (+), iar cea de a doua celui levogir (—). Aceste configurații proiectate în planul hîrtiei conduc la formulele de proiecție:



Atomii de carbon asimetrici din celelalte monozaharide sînt reprezentați prin înrudirea lor configurațională cu atomii de carbon asimetrici ai celor două gliceraldehide, independent de sensul activității lor optice. Un atom de carbon asimetric cu o configurație spațială identică cu a carbonului asimetric al (+)-gliceraldehidei se numește carbon asimetric cu configurație dreaptă (fie că are activitate dextrogiră, fie levogiră). În mod reciproc un carbon asimetric cu configurație stîngă este înrudit configurațional cu atomul asimetric al (—)-gliceraldehidei.

Monozaharidele care cuprind mai mulți atomi de carbon asimetrici există sub forma a mai mulți stereoizomeri deoarece fiecare carbon asimetric în parte prezintă două configurații opuse. Din aceste motive există 4 aldotetroze, 8 aldopentoze și 16 aldohexoze. Cetozele au un carbon asimetric mai puțin decît aldozele cu același număr de atomi de carbon și de două ori mai puțini stereoizomeri. Acești stereoizomeri pot fi grupați în perechi de enantiomeri. Moleculele unei perechi diferă prin configurațiile tuturor atomilor de carbon asimetrici, ele sînt în relația de obiect și imaginea sa în oglindă. Stereoizomerii care cuprind mai mulți atomi de carbon asimetrici dar diferă numai prin configurațiile unora dintre carbonii asimetrici se numesc diastereoizomeri (sau diastereomeri). Diastereomerii se diferențiază între ei prin proprietăți fizice, chimice, prin activitatea lor optică în ceea ce privește intensitatea și eventual prin sensul în care rotesc planul de polarizare a luminii.

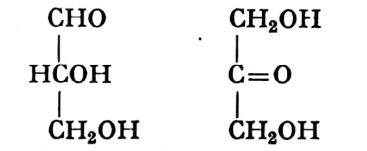
De exemplu stereoizomerii aldotetrozei sînt:



Din multitudinea de forme stereoizomere ale monozaharidelor în natură nu se găsesc decît puţine. În primul rînd dintr-o pereche de enantiomeri numai unul dintre ei este sintetizat în lumea vie datorită specificităţii sterice absolute a enzimelor. De pildă, în lumea vie nu există decît glucoza dextrogiră, fructoza levogiră. În al doilea rînd, o anumită specie cuprinde numai unii dintre diastereomeri.

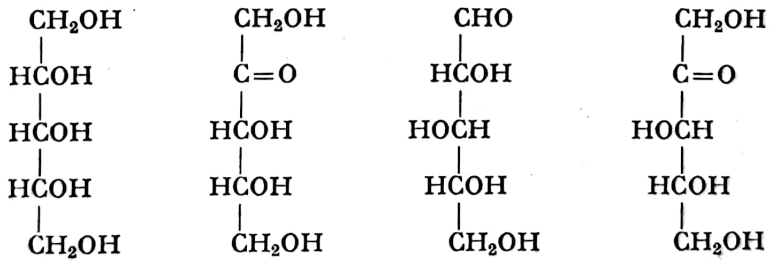
Se consideră că monozaharidele cu mai mult de trei atomi de carbon se formează prin adăugarea succesivă de atomi de carbon la C_1 al gliceraldehidei. Aceasta face ca în toate monozaharidele care derivă din (+)-gliceraldehidă atomul asimetric cel mai depărtat de gruparea carbonilică să aibă configuraţie dreaptă (deci identică cu configuraţia carbonului asimetric al triozei). Această familie de monozaharide alcătuiesc seria sterică D. În mod similar, monozaharidele care derivă din (—)-gliceraldehidă alcătuiesc seria sterică L, carbonul asimetric cel mai depărtat de gruparea carbonilică are configuraţie stîngă în monozaharidele aparţinînd acestei serii. Monozaharidele care se găsesc în natură aparţin în majoritatea lor seriei D. La plante şi la microorganisme se întîlnesc şi cîteva monozaharide aparţinînd seriei L. Pentru mamifere şi om cele mai importante monozaharide sînt:

Trioze:



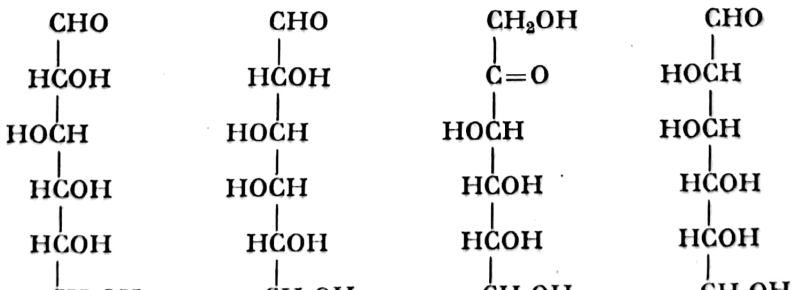
D-gliceraldehidă dihidroxiacetonă

Pentoze:



D-riboză D-ribuloză D-xiloză D-xiluloză

Hexoze:

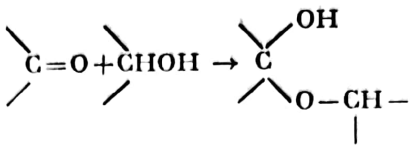


D-glucoză D-galactoză D-fructoză D-manoză

Scanned with OKEN Scanner

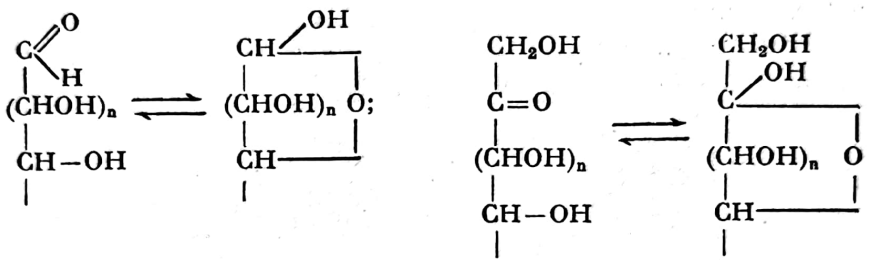
1.1.2. STRUCTURILE CICLICE ALE MONOZAHARIDELOR

Monozaharidele cuprind grupări funcţionale apte de a reacţiona împreună. Între o grupare alcoolică şi una carbonilică este posibilă reacţia de adiţie:



în urma căreia rezultă un semiacetal. La monozaharide această reacţie are loc intramolecular şi se obţin derivaţi ciclici. Din această cauză, monozaharidele pe lîngă forma lineară, cu gruparea carbonilică liberă, pot prezenta şi structuri ciclice semiacetalice.

Reacţiile generale de ciclizare, de semiacetalizare, a unei aldoze şi a unei cetoze sînt:

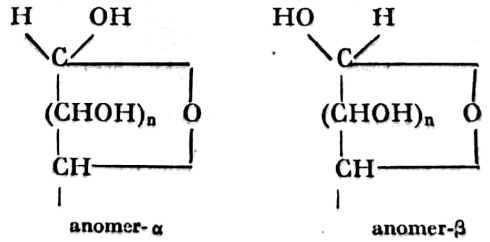


unde n=2 sau 3

Formele ciclice ale monozaharidelor pot cuprinde numai cicluri cu cinci sau şase atomi care sînt lipsite de tensiune. Structurile ciclice ale monozaharidelor cu cicluri de 5 atomi se numesc furanoze iar acelea cu şase atomi, piranoze.

Prin reacţia de semiacetalizare atomul de carbon carbonilic devine purtătorul unei grupări hidroxil, distinctă de o grupare alcoolică şi care este numită grupare semiacetalică sau glicozidică.

Transformarea formelor lineare ale monozaharidelor în structuri ciclice este însoţită de dedublarea stereoizomerilor deoarece atomul de carbon carbonilic prin semiacetalizare devine asimetric şi poate adopta două configuraţii sterice. Acestui nou gen de izomerie i se spune *anomerie*. În seria D a monozaharidelor termenul cu activitatea optică cea mai dextrogiră este denumit anomer α şi carbonului asimetric de care este legată gruparea semiacetalică i se atribuie o configuraţie dreaptă. În anomerul β acest carbon asimetric are o configuraţie opusă:

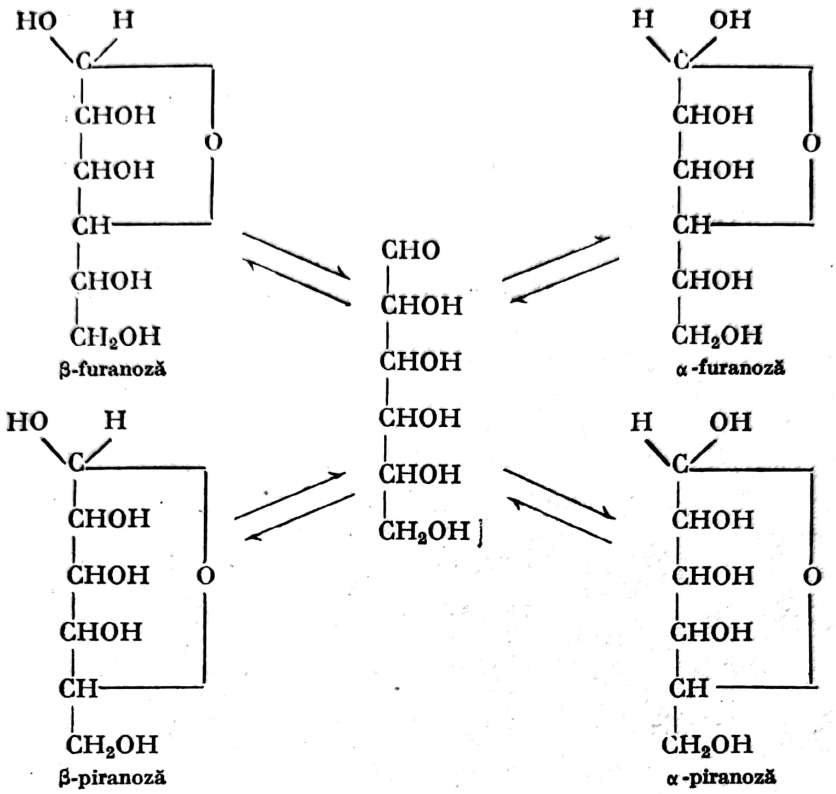


anomer-α anomer-β

În cazul glucozei, α-glucopiranoza are o activitate optică de +113,4° iar anomerul β de +19,3°.

Reacţiile de semiacetalizare sînt reversibile şi din această cauză în soluţiile apoase ale monozaharidelor, forma lineară carbonilică se află în echili-

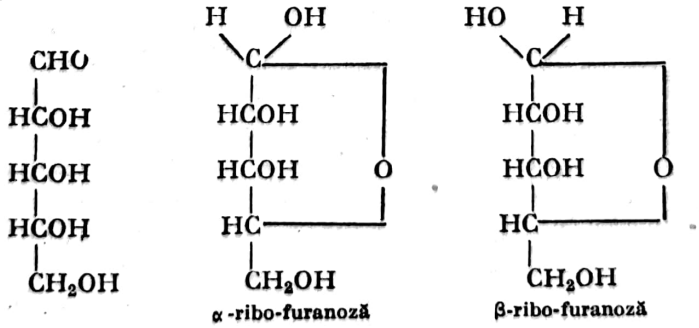
bru cu diversele structuri ciclice posibile: α-furanozică, β-furanozică, α-piranozică şi β-piranozică. În genere, pentru o aldohexoză acest sistem în echilibru poate fi redat:



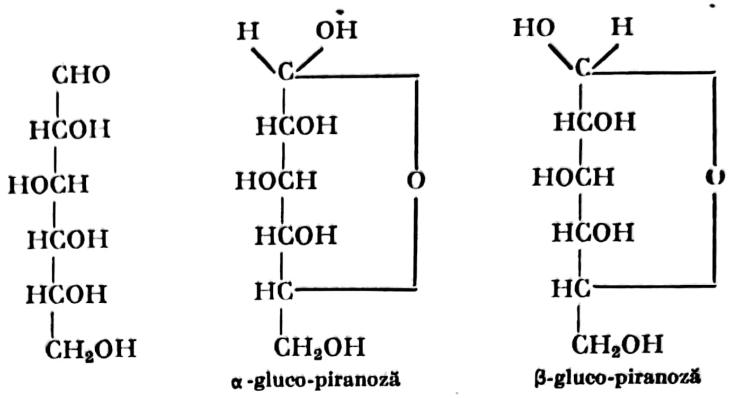
Formele piranozice sînt în genere mult mai stabile decît cele furanozice şi ele predomină în soluţiile monozaharidelor. Prin cristalizare din soluţii se pot obţine în stare pură unul sau altul din anomeri, în funcţie de solubilitatea acestora în diverşi solvenţi. Din soluţiile apoase de glucoză cristalizează α-glucopiranoza a cărei solubilitate este mult mai mică decît a anomerului β. Din contră, aceasta din urmă se poate obţine în stare pură prin cristalizarea glucozei dintr-un solvent organic, piridină. Prin dizolvarea în apă a oricăruia dintre anomeri, dacă se lasă suficient timp pentru a se stabili echilibrul între aceştia, se obţine un amestec care cuprinde 36% α-gluco-piranoză şi 64% β-gluco-piranoză şi a cărui activitate optică specifică este de +52,5°.

Structurile ciclice ale monozaharidelor mai importante, redate cu ajutorul formulelor de proiecţie, sînt următoarele:

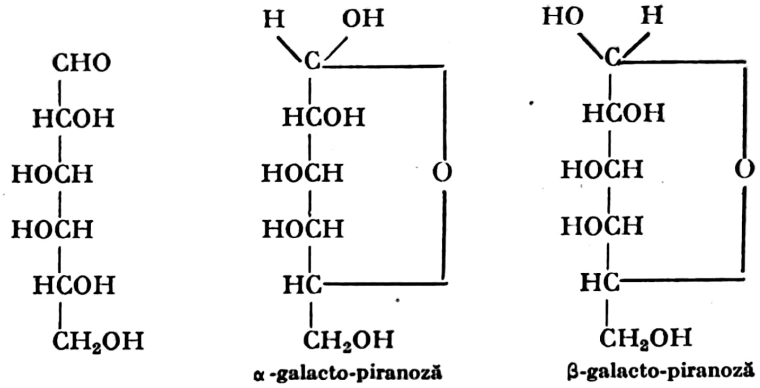
Riboza prezintă structuri furanozice:



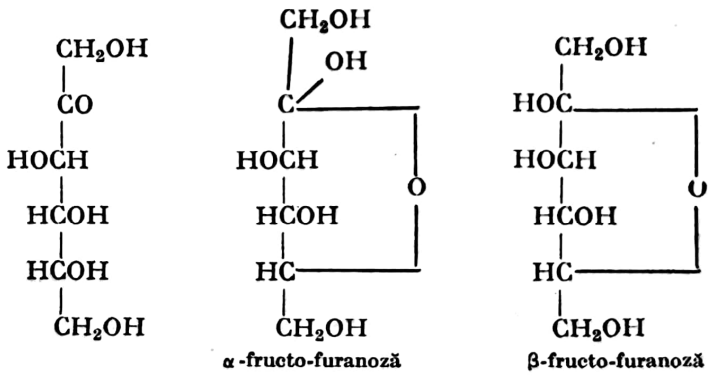
Glucoza prezintă structuri piranozice:



Galactoza prezintă structuri piranozice:



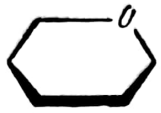
Fructoza în derivaţii ei mai importanţi apare în forme furanozice:



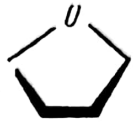
Reprezentarea structurilor ciclice ale monozaharidelor cu ajutorul formulelor de perspectivă (Haworth). Formulele ciclice de proiecţie ale monozaharidelor sînt utilizate destul de frecvent deoarece înrudirea lor cu formele carbonilice, lineare, apare de la prima vedere. Totuşi în formulele de proiecţie relaţiile stereochimice dintre diverşi atomi sau grupuri de atomi nu sînt redate corect. Pentru aceasta s-a propus reprezentarea structurilor ciclice în perspectivă (formule Haworth). În aceste formule ciclurile sînt reprezentate prin poligoane regulate situate într-un plan perpendicular pe planul hîrtiei şi sînt văzute dintr-o incidenţă oblică. Laturile mai apropiate de observator sînt îngroşate. Valenţele atomilor de carbon cuprinşi în ciclu sînt orientate perpendicu-

Scanned with OKEN Scanner

lar pe planul ciclului, una deasupra și alta dedesubt. Cînd succesiunea atomilor de carbon în ciclu se face în sensul acelor de ceasornic (în formele seriei optice D), grupările care în formulele de proiecție sînt situate în dreapta catenei de atomi de carbon se scriu sub planul ciclului în formulele de perspectivă.



ciclu piranozic



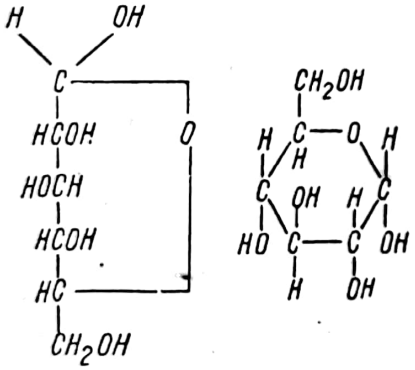
ciclu furanozic

De asemenea, la reprezentarea structurilor ciclice ale monozaharidelor cu formule Haworth se consideră că atomul de carbon asimetric din ciclu cu numărul de ordine cel mai mare (cel mai depărtat de gruparea carbonilică) a suferit în prealabil o rotație de 180°, presupunere ce nu modifică configurația sterică a acestui carbon.

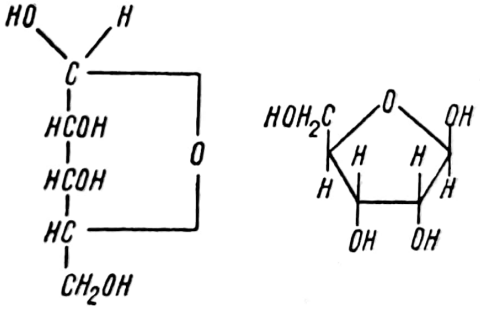
Formulele Haworth mai prezintă față de cele de proiecție, avantajul că ele pot fi rotite în spațiu sub orice unghi fără a-și pierde individualitatea. Totuși, ele sînt utilizate curent în poziția dată mai înainte.

Ținîndu-se seama de regulile de scriere, formulele ciclice în proiecție și în perspectivă a cîtorva monozaharide sînt următoarele:

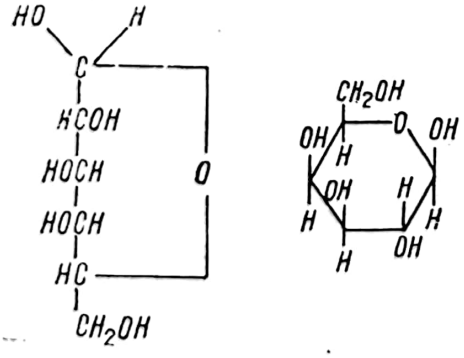
α-gluco-piranoză:



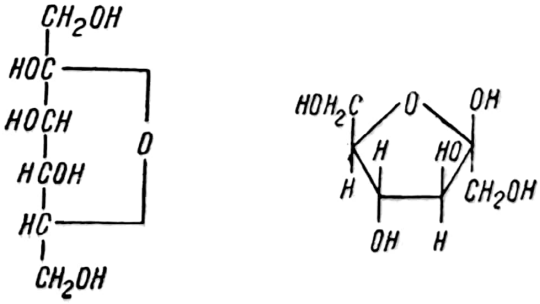
β-ribo-furanoză:



β-galacto-piranoză:



β-fructo-furanoza:



1.1.3. PROPRIETĂȚILE MONOZAHARIDELOR

Monozaharidele sînt substanțe solide, cristalizate. Numărul mare de grupări hidroxilice conferă acestor compuși caracter polar și hidrofil. Sînt ușor solubile în apă dar sînt insolubile în solvenți nepolari. Au gust dulce, fructoza fiind cel mai dulce compus din această clasă.

Scanned with OKEN Scanner

Monozaharidele prezintă o varietate largă de reacţii chimice ce le sînt conferite de funcţiile alcoolice şi carbonil pe care le cuprind. În soluţia unui monozaharid pe lîngă diversele structuri ciclice se află într-o proporţie mică şi forma carbonilică. Dacă una din aceste forme este consumată de un reactiv specific, prin deplasarea echilibrului în favoarea ei, se poate transforma întreaga cantitate de monozaharid într-un derivat al unei singure forme: de exemplu, al structurii carbonilice sau al unuia sau altuia dintre anomeri. Din această cauză în ecuaţiile reacţiilor chimice ale monozaharidelor figurează acea formă care participă efectiv la reacţie.

Proprietăţile chimice ale monozaharidelor vor fi studiate luîndu-se în consideraţie importanţa lor biochimică. Unele din reacţiile monozaharidelor sînt folosite pentru identificarea şi dozarea lor în diverse medii biologice ca: sînge, urină, lichid cefalo-rahidian. Alte reacţii ale monozaharidelor stau la baza biosintezei şi a transformărilor lor metabolice. În sfîrşit, monozaharidele prezintă o serie de derivaţi de importanţă biochimică, unii dintre ei rezultînd numai prin activitatea metabolică a organismelor vii, sinteza lor în laborator fiind încă nerealizată.

Proprietăţile care stau la baza principalelor reacţii şi teste de analiză a monozaharidelor sînt: caracterul reducător, descompunerea în prezenţă de acizi minerali tari şi diverse reacţii de condensare. Monozaharidele sînt substanţe uşor oxidabile atît în soluţii acide dar mai ales în medii alcaline. Această însuşire le este conferită de gruparea carbonilică fiind însă mult accentuată de învecinarea acesteia cu grupări alcoolice. Au caracter reducător nu numai aldozele dar şi cetozele care cuprind o grupare cetonică. Se admite că în condiţiile de reacţie, medii alcaline sau acide, au loc izomerizări cetoză$\rightleftharpoons$ aldoză.

Proprietăţile reducătoare ale monozaharidelor sînt evidenţiate prin introducerea lor în soluţiile unor săruri complexe de metale tranziţionale, cupru, argint, bismut. Ionii acestor metale sînt reduşi la valenţe inferioare. Testele Fehling, Benedict au la bază reducerea ionilor Cu^{2+}, complexaţi de ionii tartrat sau citrat, la oxid cupros, care se separă sub forma unui precipitat roşu. În cazul testelor Tollens şi Nylander are loc reducerea ionilor Ag^{+} sau Bi^{3+} la metale ce se depun ca precipitate negre sau în anumite condiţii argintul poate forma oglindă pe pereţii vasului de reacţie (reacţia oglinzii de argint).

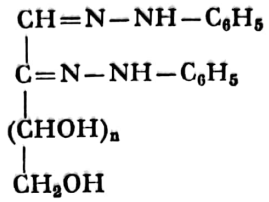
În condiţiile în care se practică testele bazate pe proprietăţile reducătoare ale monozaharidelor, de exemplu testele Fehling şi Benedict, monozaharidele suferă oxidări complexe, cu ruperea catenei de atomi de carbon, obţinîndu-se diverşi produşi de reacţie.

Un grup important de reacţii utilizate în analiza calitativă şi cantitativă a monozaharidelor se bazează pe descompunerea acestora prin tratare cu acizi minerali concentraţi (HCl sau H_2SO_4) şi cuplarea imediată a produşilor de reacţie cu diverşi fenoli, amine etc., obţinîndu-se compuşi coloraţi. Aceste reacţii sînt foarte numeroase şi totodată sînt specifice pentru anumite grupuri de monozaharide. Cu ajutorul lor pot fi diferenţiate aldozele de cetoze, sau hexozele de pentoze.

O reacţie care permite identificarea unor monozaharide individuale şi nu a unor grupuri, este condensarea lor cu fenilhidrazina ($C_6H_5-NH-NH_2$). Prin asocierea unei reacţii de condensare cu una de oxidare, monozaharidele

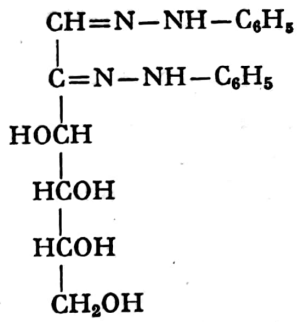
Scanned with OKEN Scanner

sînt transformate în osazone, substanţe galbene cristalizate. Diversele osazone pot fi identificate după forma cristalelor, prin observarea lor la microscop.

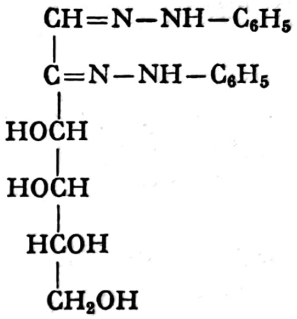


Formula generală a unei osazone.

La formarea unei osazone participă grupările (carbonil şi alcool) situate la C_1 şi C_2, astfel încît monozaharidele care se diferenţiază numai prin structurile sau configuraţiile acestor atomi dau osazone identice. În această situaţie se află glucoza şi fructoza. Galactoza formează însă o osazonă distinctă de glucosazonă.

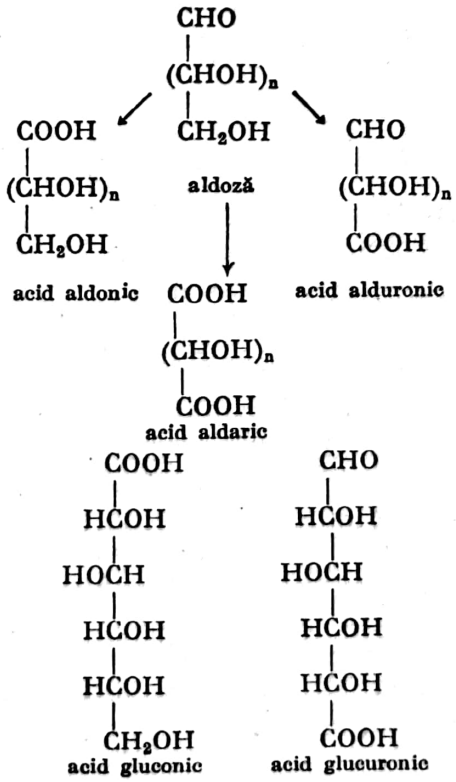


Osazona glucozei şi a fructozei



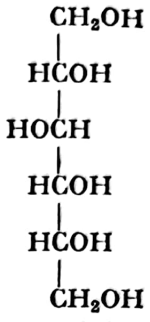
Osanoza galactozei

Produşii de oxidare a monozaharidelor. Prin oxidarea grupărilor terminale ale unei aldoze se pot forma, în principiu, trei tipuri de derivaţi: acizi aldonici, acizi alduronici şi acizi aldarici (sau zaharici):



Acizii aldonic și alduronic ai glucozei, respectiv acidul gluconic și acidul glucuronic, sînt compuși deosebit de importanți din punct de vedere biochimic. Acești compuși pot exista și sub forme ciclice. La acizii alduronici structurile ciclice sînt semicetali, pe cînd forma ciclică a unui acid aldonic este un ester intern, o lactonă.

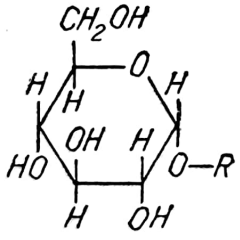
glucono-lactona



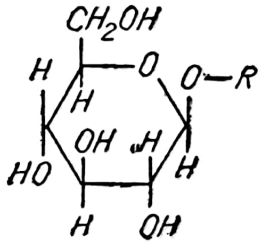
sorbitol

Produșii de reducere a monozaharidelor. Prin hidrogenarea grupării carbonil, monozaharidele se transformă în polioli. Din punct de vedere biochimic este important derivatul glucozei și al fructozei. Prin hidrogenarea enzimatică, stereo-specifică, ambele hexoze dau naștere la același hexitol, la sorbitol.

Glicozidele. Prin interacțiunea grupărilor semiacetalice ale monozaharidelor cu alte funcții hidroxilice se obțin derivați ce poartă denumirea de glicozide. Glicozidele ce derivă de la glucoză se numesc glucozide, de la fructoză fructozide, de la riboză ribozide și așa mai departe. Glicozidele există numai sub forma unuia din cei doi anomeri, α sau β, și aceștia nu se mai transformă unul în altul în soluție, gruparea semiacetalică fiind blocată în legătura glicozidică. Din aceste motive la un glicozid se precizează natura α sau β a legăturii. Formulele generale ale unui α- și β-glucozid sînt:



α-glucozid



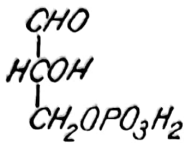
β-glucozid

Oligozaharidele și polizaharidele sînt derivați de natură glicozidică, ei rezultă prin interacțiuni ale grupărilor semiacetalice ale monozaharidelor. De asemenea, se cunosc și glicozide la care participă compuși azotați (N-glicozide). În nucleozide legătura dintre componenta glucidică și baza azotată este o legătură N-glicozidică.

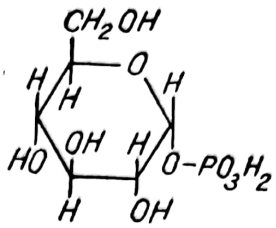
Esterii fosforici ai monozaharidelor. Acești derivați sînt formele metabolic active ale monozaharidelor. Ei au caracter acid destul de pronunțat și la pH-ul fiziologic se află sub formă de săruri. Din această cauză acești compuși sînt adesea citiți ca săruri. Totuși, formulele lor pentru simplitate sînt totdeauna scrise ca acizi.

Scanned with OKEN Scanner

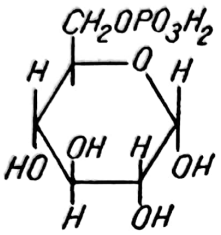
Cîţiva dintre aceşti derivaţi sînt:



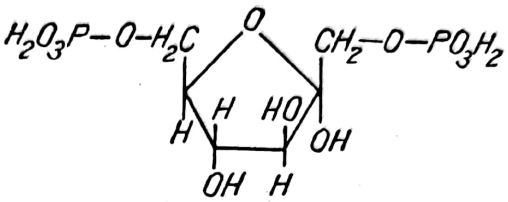
gliceraldehidă-3-fosfat



glucoză-1-fosfat (Glc-1-P)

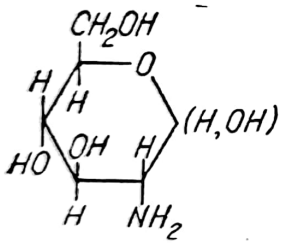


glucoză-6-fosfat (Glc-6-P)

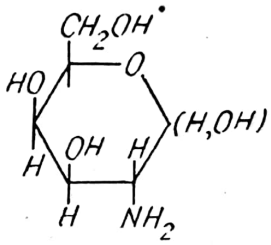


fructoză-1,6-difosfat (F-1,6-P)

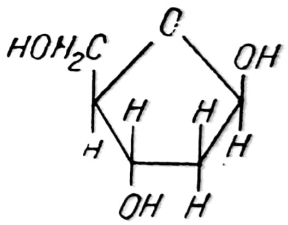
Aminozaharurile. Prin înlocuirea unei grupări alcoolice din molecula unui monozaharid cu o funcţie aminică (—NH_2) se obţine un derivat denumit aminozahar. Glucozamina şi galactozamina sînt cele mai importante substanţe din acest grup, ele intrînd în constituţia mucopolizaharidelor.



∝(β)-glucozamină



∝(β)-galactozamină



2-dezoxiriboza

Dezoxizaharurile. Un derivat al unui monozaharid cu un atom de oxigen mai puţin decît numărul atomilor de carbon este un dezoxizahar. Un compus important din această categorie este 2-dezoxiriboza, constituentul glucidic al acizilor dezoxiribonucleici.

1.2. OLIGOZAHARIDELE

Sînt compuşi ce derivă prin condensarea a două sau mai multor (pînă la aproximativ zece) molecule de monozaharide. Oligozaharidele cele mai importante sînt dizaharidele rezultate din două molecule de hexoză:

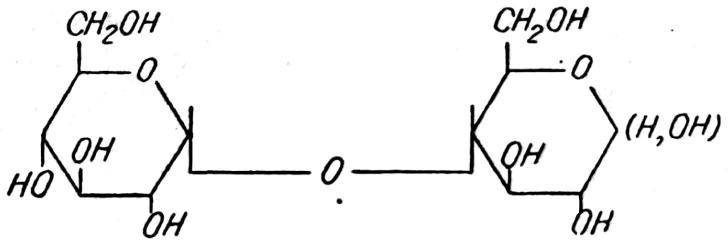
$$2\,C_6H_{12}O_6 \rightarrow C_{12}H_{22}O_{11} + H_2O$$

Scanned with OKEN Scanner

Legătura care reunește cele două resturi de hexoză este o legătură glicozidică. La formarea acesteia participă totdeauna gruparea hidroxilică semiacetalică a uneia dintre monozaharide. Cea de a doua grupare funcțională participantă la formarea legăturii poate fi tot o grupare glicozidică (legătură diglicozidică sau dicarbonilică) sau o grupare alcoolică (legătura monoglicozidică sau monocarbonilică). În dizaharidele cu legătură monoglicozidică gruparea carbonil a uneia dintre hexoze fiind neangajată va prezenta reacțiile ce îi sînt caracteristice: anomerie, caracter reducător și altele; întrucît caracterul reducător este ușor de recunoscut el este luat drept criteriu de clasificare a dizaharidelor. Dizaharidele cu legătură diglicozidică între hexoze nu mai prezintă însușiri reducătoare întrucît ambele grupări carbonilice ale moleculelor participante sînt angajate în legătura glicozidică.

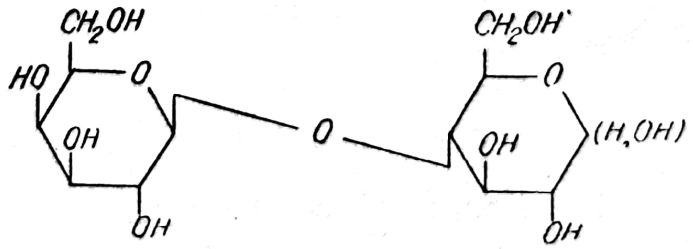
Dizaharidele importante pentru nutriția și metabolismul omului sînt maltoza, lactoza (dizaharide reducătoare) și zaharoza (nereducătoare).

Maltoza derivă formal din două molecule de glucoză prin eliminare de apă între gruparea glicozidică a unei molecule și gruparea alcoolică de la C_4 a celeilalte (legătură α-(1→4)-glicozidică). Maltoza liberă se află în cantități mici la unele specii de plante. Importanța acestui dizaharid constă în aceea că se formează prin hidroliza enzimatică a amidonului și a glicogenului în tubul digestiv al omului sub acțiunea amilazei din salivă și din sucul pancreatic.



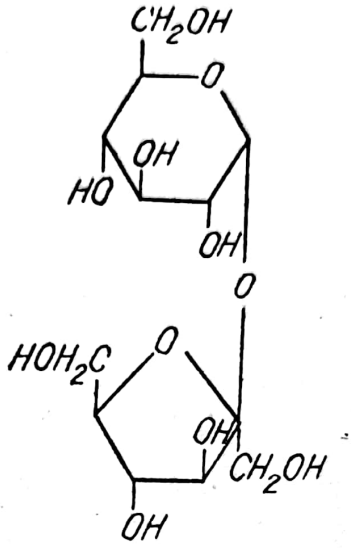
maltoză (α-glucopiranozido-4-glucopiranoză)

Lactoza. La formarea acestui dizaharid participă o moleculă de galactoză și una de glucoză. Legătura monoglicozidică ce reunește aceste două hexoze în lactoză se formează prin eliminare de apă între gruparea glicozidică a β-galactozei și gruparea alcoolică de la C_4 a glucozei (legătură β-galactozidică). Lactoza este zaharul din laptele mamiferelor și este sintetizată în glanda mamară în timpul lactației pornindu-se de la glucoză. Prezintă importanță nutritivă mai ales pentru sugari și copii.



lactoză (β-galactopiranozido-4-glucopiranoză)

Zaharoza. Este un dizaharid nereducător la formarea căruia participă o moleculă de glucoză în formă α-piranozică şi o moleculă de fructoză în formă β-furanozică. Prin condensare se elimină apa între cele două grupări glicozidice (legătură α-glucozidică-β-fructozidică). Zaharoza este foarte răspîndită în lumea vegetală, fiind absentă în regnul animal. Pentru om are valoare nutritivă deoarece în tubul digestiv este scindată în cele două hexoze.



zaharoză (α-glucopiranozido-β-fructofuranozid)

1.3. POLIZHARIDELE (GLICANII)

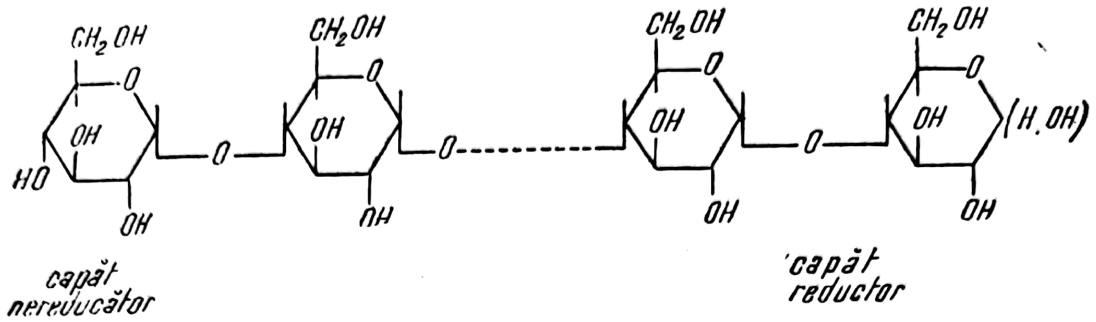
Polizaharidele sau glicanii sînt produşi de policondensare a monozaharidelor. Ele pot rezulta din monozaharide tipice, aldoze sau cetoze sau din derivaţii acestora, acizi uronici, aminozaharuri, esteri. Unele polizaharide cuprind, respectiv, o singură unitate glicozil (homoglicanii), pe cînd altele cuprind mai multe tipuri de unităţi structurale care alternează regulat (heteroglicanii). Rolul biologic al polizaharidelor în natură este acela de materiale structurale sau reprezintă forme de depozitare a rezervelor energetice ale celulelor. Din prima categorie fac parte celuloza, cel mai răspîndit compus organic din natură, mucopolizaharidele, componente plastice ale ţesuturilor conjunctive, polizaharidele, ce alcătuiesc pereţii celulelor bacteriene. Dintre polizaharidele de depozit, amidonul din regnul vegetal şi glicogenul din ţesuturile animale sînt cele mai importante. Pentru biochimia animală, o importanţă deosebită prezintă amidonul, componentă principală a raţiei alimentare a omului şi a altor mamifere.

Amidonul. Acest polizaharid este foarte răspîndit la plante, fiind forma în care se depozitează în celule surplusul de hidraţi de carbon. Este foarte puţin solubil în apă şi în celule se găseşte sub formă de granulaţii cu forme şi dimensiuni caracteristice fiecărei specii vegetale. Amidonul nu este o substanţă unitară, ci un amestec de două polizaharide, amiloză (aproximativ 20%) şi amilopectină (aproximativ 80%). Ambele componente sînt alcătuite numai din resturi glucozil; în amiloză acestea formează lanţuri lineare pe cînd amilopectina are o structură ramificată.

Amiloza este constituită din resturi glucozil reunite prin legături α-(1→1)-glicozidice. Acest tip de legătură reuneşte şi cele două resturi de glu-

Scanned with OKEN Scanner

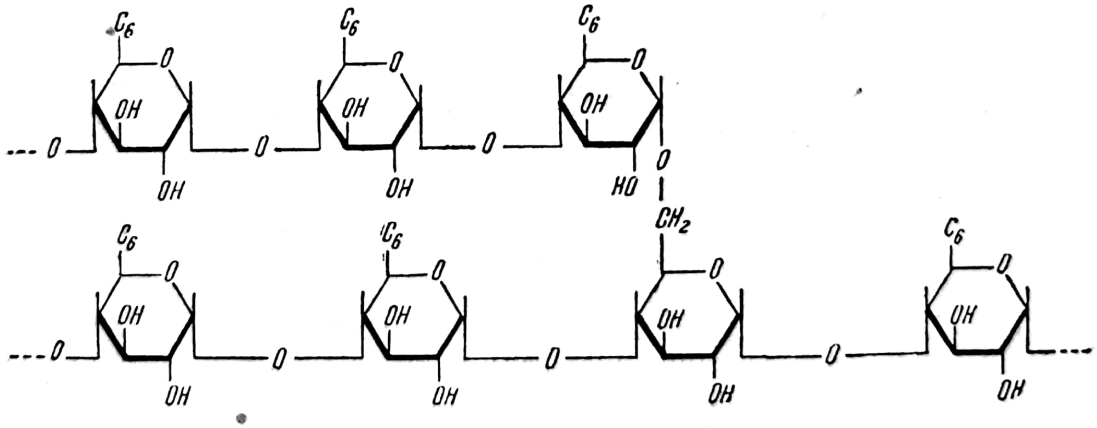
coză în maltoză astfel că se poate spune că maltoza este unitatea repetitivă a amilozei. Un lanț amilozic are următoarea constituție:



Capetele unei molecule de amiloză sînt diferite. Restul glucozil terminal de la unul din capete are gruparea carbonilică (semiacetalizată) neangajată în legătură și acesta este capătul reducător al lanțului. La capătul opus al moleculei se află un rest glucozil angajat în legătură cu restul glucozil adiacent prin gruparea sa glicozidică. Scindarea enzimatică și biosinteza lanțurilor amilozice se efectuează începînd de la capetele lor nereducătoare.

Amiloza pură se prezintă ca o substanță albă cu aspect amorf. Lanțurile amilozice lineare sînt răsucite helicoidal, un pas al helicei cuprinzînd 5—6 resturi glicozil. Molecula de amiloză se hidratează puternic dînd naștere la soluții coloidale. Cu iodul formează un compus de incluziune colorat în albastru.

Amilopectina. Acest component al amidonului are o structură ramificată, arborescentă, pentru că resturile glicozil sînt reunite prin două tipuri de legături glicozidice: legături α-(1→4)- și α-(1→6)-glicozidice. Porțiunile liniare din amilopectină au structură amilozică, ele cuprind între 18—26 resturi glicozil reunite prin legături α-(1→4)-glicozidice. La punctele de ramificare se află legături α-(1→6)-glicozidice). O porțiune dintr-o moleculă de amilopectină este redată mai jos:



Amilopectina are greutăți moleculare mult mai mari decît ale amilozei. Nu se dizolvă în apă. Tratată cu apă caldă și apoi răcită dă naștere la geluri. Cu iodul dă o colorație roșie.

Glicogenul. Acest polizaharid reprezintă forma de depozitare a excesului de hidrați de carbon din organismele animale. Toate celulele cuprind glicogen dar prin mărimea depozitului numai glicogenul din ficat și cel din mușchi

au importanţă în economia organismului. Este un polizaharid cu structură ramificată alcătuit din resturi de glucoză. Din punct de vedere structural se aseamănă cu amilopectina, cuprinzînd aceleaşi genuri de legături glicozidice: legături α-(1→4)- în segmentele lineare amilozice şi legături α-(1→6)-glicozidice la punctele de ramificare. În glicogen gradul de ramificare este mult mai accentuat decît la amilopectină, porţiunile amilozice dintre două puncte de ramificare cuprind numai 8—10 resturi glicozil. Greutatea moleculară a glicogenului variază în cursul metabolismului ajungînd pînă la valori de cîteva milioane. În celula hepatică glicogenul se află sub formă de granule îngrămădite în vecinătatea reticulului endoplasmatic. Glicogenul cu iodul dă o coloraţie roşie.

2. DIGESTIA ŞI ABSORBŢIA GLUCIDELOR

Componentele glucidice principale ale raţiei alimentare a omului sînt amidonul, zaharoza şi lactoza. Monozaharidele glucoza şi fructoza se află în alimente în cantităţi mult mai mici, în special în fructe şi în miere. La sugari şi la copii predomină lactoza, zahărul din lapte. Celuloza este şi ea cuprinsă în cantităţi variabile în alimentele de origine vegetală, dar acest polizaharid nefiind hidrolizat în tubul digestiv al omului nu are valoare nutritivă.

Prin mucoasa intestinală nu trec decît monozaharide astfel încît oligo- şi polizaharidele din raţie sînt hidrolizate pînă la monozaharidele componente. Hidrolazele care catalizează scindarea legăturilor glicozidice — glicozidaze — manifestă specificitate de acţiune, atît în raport cu natura zaharului care furnizează gruparea glicozidică angajată în legătură, cît şi după natura anomerului α sau β (α- şi β-glucozidaze, α- şi β-galactozidaze).

Hidroliza glucidelor alimentare începe în gură prin atacul amidonului de către amilaza salivară, continuînd apoi în intestin prin acţiunea amilazei pancreatice şi a oligo- şi dizaharidazelor enterice.

Amidonul este hidrolizat sub acţiunea a două enzime cu acţiuni specifice asupra celor două tipuri de legături glicozidice cuprinse în acest polizaharid: α-amilaza, specifică pentru legăturile α-(1→4)-glicozidice şi o α-(1→6)-glucozidază. Amiloza care cuprinde numai legături α-(1→4)-glicozidice este scindată de amilază pînă la maltoză şi glucoză. Atacul polizaharidului de către amilază are loc la întîmplare în diferite puncte din mijlocul lanţului, molecula fiind ruptă mai întîi în fragmente polizaharidice denumite dextrine. Prin acţiunea prelungită a enzimei amiloza este scindată în totalitate în maltoză şi glucoză. Amilopectina care pe lîngă legăturile α-(1→4)-glicozidice cuprinde şi legături α-(1→6)-glicozidice este hidrolizată pînă la maltoză şi glucoză prin acţiunea combinată a amilazei şi a unei oligo-(1→6)-glucozidaze. Amilaza are pH-ul optim de acţiune în jurul pH-ului neutru şi este activată de anionii Cl^-. Dizaharidele maltoză, zaharoză, lactoză sînt hidrolizate de maltază (α-glucozidază), de zaharază (α-glucozidază) şi respectiv de lactază (β-galactozidază), enzime sintetizate de enterocite.

Amilaza şi celelalte glicozidaze sînt prezente în tubul digestiv de la naştere, dar ele suferă cu vîrsta ample variaţii cantitative. Activitatea amilazei la nou născut este mult mai mică decît la adult. Activitatea lactazei suferă o

Scanned with OKEN Scanner

variaţie inversă, este mai mare la nou născut şi scade cu vîrsta. Activităţile maltazei şi zaharazei se modifică puţin cu vîrsta.

Monozaharidele prezente ca atare în raţie sau rezultate prin hidroliza dizaharidelor şi a polizaharidelor sînt absorbite prin mucoasa intestinală şi ajung în sistemul portal hepatic. Glucoza şi galactoza traversează enterocitele legate de aceleaşi proteine transportoare (translocaze). Procesul este dependent energetic de metabolismul celular. Fructoza este vehiculată de un sistem distinct. Absorbţia mai rapidă a fructozei este probabil facilitată de transformarea sa parţială la nivelul enterocitelor în glucoză, concentraţia intracelulară a fructozei rămînînd la un nivel coborît. După traversarea mucoasei monozaharidele ajung prin vena portă la ficat. La nivelul ficatului fructoza şi galactoza sînt convertite în glucoză fiind metabolizáte numai sub această formă.

Degradarea hidrolitică şi absorbţia intestinală a glucidelor şi a altor substanţe nutritive sînt integrate structural şi funcţional asigurîndu-se o eficienţă maximă a sistemelor implicate. Prin structura microvilară a mucoasei intestinale se realizează între suprafaţa şi greutatea ţesutului un raport apropiat de cel al catalizatorilor poroşi (5×10^5 cm^2/g). Multă vreme s-a crezut că digestia are loc în cavitatea intestinală, după care produşii de hidroliză traversează mucoasa. Acest mod de acţiune nu poate explica însă viteza foarte mare cu care sînt digerate şi absorbite alimentele. Digestia glucidelor dintr-o raţie obişnuită este terminată în 2—4 ore, ori din activitatea luminală a glicozidazelor s-a evaluat că acest proces ar necesita 8—10 zile. Substratul morfologic al digestiei şi absorbţiei intestinale este constituit de membrana enterocitelor care proemineză luminal în formă de perie (brush border) şi de o textură de mucopolizaharide care căptuşeşte suprafaţa luminală a membranei (glicocalix). Hidrolazele elaborate de enterocite nu sînt eliberate în cavitatea intestinală, ele se concentrează şi acţionează în marginea în perie a celulelor, monozaharidele fiind eliberate în vecinătatea imediată a sistemelor de transport. De asemenea, amilaza pancreatică este absorbită pe suprafaţa glicocalixului şi printre ochiurile reţelei. Macromoleculele polizaharidice cu dimensiuni mari sînt scindate mai întîi la suprafaţă după care fragmentele mai mici sînt hidrolizate progresiv în timp ce străbat glicocalixul, astfel încît pe marginea în perie ajung doar dizaharidele ce vor fi supuse acţiunii dizaharidazelor. Sistemele de transport preiau imediat monozaharidele, asigurîndu-se continuitatea proceselor hidrolitice şi absorbţia produşilor de digestie.

3. DEGRADAREA OXIDATIVĂ A GLUCOZEI

Rolul metabolic fundamental al glucozei este acela de a furniza energie prin degradarea moleculei sale bogate în carbon şi hidrogen. Organismul dispune şi de alte substrate energetice (acizi graşi, aminoacizi) dar pentru anumite ţesuturi (creier, hematii) şi în anumite circumstanţe (anoxie) glucoza este unicul compus apt să joace acest rol. Forma activă a glucozei care iniţiază secvenţele metabolice este glucozo-6-fosfatul (Glc-6-P). Resturile

Scanned with OKEN Scanner

glucozil din Glc-6-P ce urmează a fi degradate provin din trei surse: glucoză sanguină, prin sinteză din precursori neglucidici (gluconeogeneză) sau prin dislocarea glicogenului tisular (glicogenoliză). Degradarea glucozei din una sau alta din aceste surse depinde de factori metabolici, nutriţionali şi hormonali, aspecte ce vor fi tratate mai departe. Gluconeogeneza şi glicogenoliza furnizează glucoza ca Glc-6-P. Glucoza sanguină după traversarea membranei celulare (prin mecanisme diferite de la un ţesut la altul) este fosforilată prin reacţia:

$$\text{glucoză} + \text{ATP} \rightarrow \text{Glc.}-6-\text{P} + \text{ADP}$$

catalizată de hexokinază şi de glucokinază. Prima enzimă cu o specificitate mai largă este prezentă în toate ţesuturile. Din contră, glucokinaza se află numai în ficat avînd un rol important în reglarea trecerii glucozei din sînge în ficat. Constanta Michaelis a glucokinazei are o valoare relativ mare (0,01 M) şi la nivelurile normale ale glicemiei ea nu este saturată cu substrat. Din această cauză viteza reacţiei glucokinazei se poate modifica corelativ cu fluctuaţiile fiziologice ale glicemiei. În perioadele absorbtive cînd glicemia este crescută influxul hepatic de glucoză este accelerat prin creşterea vitezei de fosforilare a glucozei la Glc-6-P sub acţiunea glucokinazei. Mai mult decît atît, glucokinaza este o enzimă inductibilă, hiperglicemia şi hiperinsulinemia acţionînd ca factori inductori.

Degradarea intracelulară a glucozei are loc în trei moduri:

a) Transformare în acid lactic, proces anaerob, independent de prezenţa oxigenului (glicoliză, calea Embden-Meyerhof).

b) Oxidare (ardere) completă pînă la bioxid de carbon şi apă.

c) Transformare în pentoze şi bioxid de carbon (calea fosfo-gluconatului sau şuntul pentozo-fosfaţilor).

3.1. GLICOLIZA (CALEA EMBDEN-MEYERHOF)

Glicoliza constă dintr-un ansamblu de reacţii prin care glucoza este transformată în acid lactic:

$$C_6H_{12}O_6 \rightarrow 2\,CH_3-CHOH-COOH$$

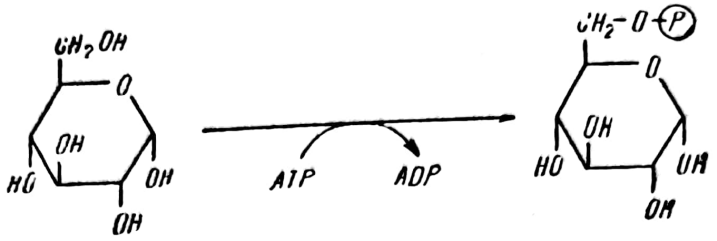
Procesul mobilizează energie ($\Delta G^\circ = -47$ Kcal) care serveşte la sinteza de ATP prin fosforilări oxidative cuplate cu oxidarea unor intermediari ai secvenţei. Glicoliza are loc în absenţa oxigenului, reacţiile oxidative pe care le cuprinde constau în dehidrogenări. Glicoliza este o cale metabolică primitivă şi în aspectele ei fundamentale este utilizată de toate formele vii. Pornindu-se de la glucoză, glicoliza constă din 11 reacţii, catalizate de enzime specifice (fig. IX.1). Enzimele se află în faza neorganizată a celulei (citosol).

Glicoliza poate fi disociată în două mari etape. În prima etapă glucoza suferă o serie de reacţii preparative prin care i se măreşte reactivitatea, iar în partea a doua a secvenţei au loc reacţiile oxidative. În etapa preparativă se consumă ATP în reacţii de fosforilare şi numai etapa oxidativă se desfăşoară cu sinteză cuplată de ATP.

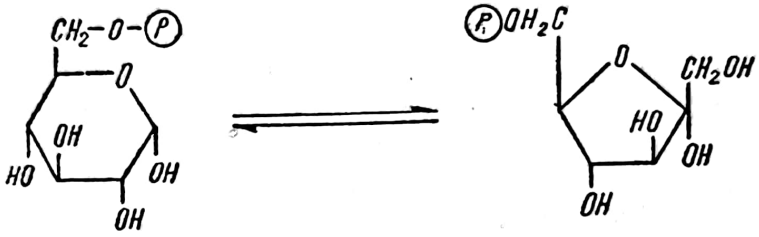
Scanned with OKEN Scanner

Reacţiile secvenţei glicolitice sînt:

(1) Fosforilarea glucozei la Glc-6-P, catalizată de hexokinază şi de glucokinază. Reacţia este ireversibilă în condiţiile intracelulare.



(2) Izomerizarea Glc-6-P la fructoză-6-P(F-6-P) catalizată de hexozofosfat izomerază.



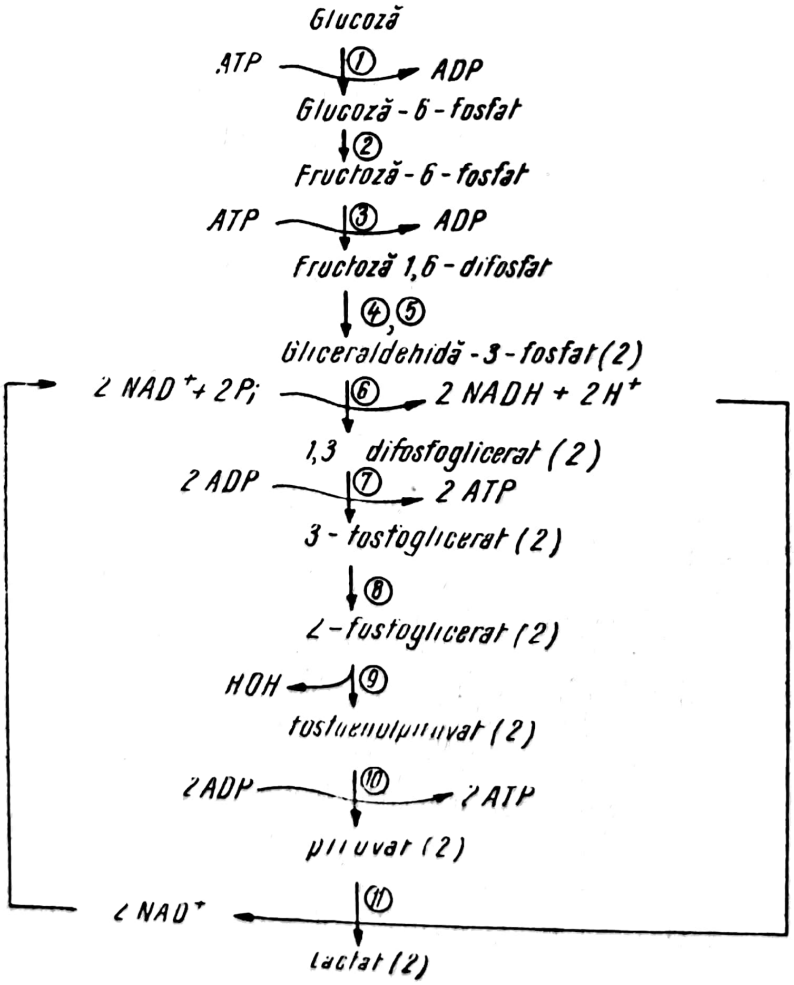
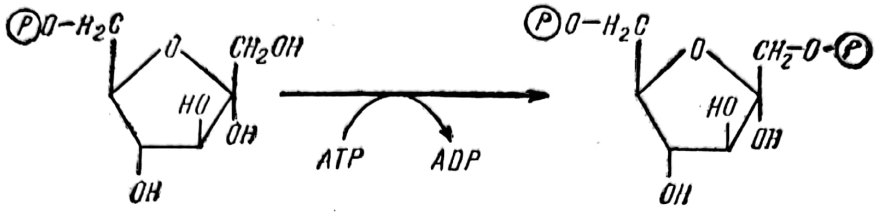


Fig. IX.1. Degradarea glucozei la acid lactic: Enzimele care catalizează cele 11 reacţii glicolitice sînt: 1 — Hexokinază şi glucokinază; 2 — Hexozofosfat izomerază; 3 — Fosfofructokinază; 4 — Aldolază; 5 — Triozofosfat izomerază; 6 — Gliceraldehidă-3-fosfat dehidrognază; 7 — 1,3-Difosfoglicerat kinază; 8 — 3-Fosfoglicerat mutază; 9 — Enolază; 10 — Fosfoenolpiruvat kinază; 11 — Lactat dehidrogenază.

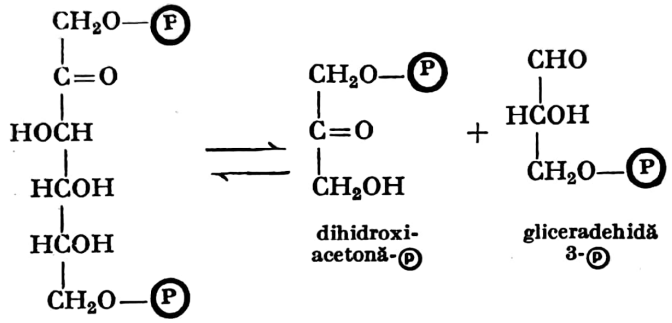
Scanned with OKEN Scanner

(3) Fosforilarea F-6-P la fructoză-1,6-difosfat (F-1,6-P) cu consumul unei molecule de ATP:



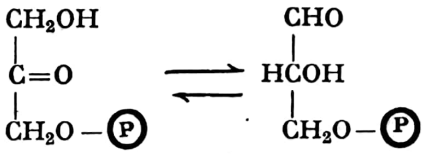
reacție ireversibilă. Este unul din punctele de control ale glicolizei. Fosfofructokinaza este o enzimă alosterică sensibilă la gradul de încărcare a sistemului ADP—ATP, este inhibată de ATP și activată de ADP.

(4) Printr-o reacție inversă unei condensări aldolice, esterul difosforic al fructozei este scindat în două fragmente a cîte trei atomi de carbon, triozofosfați:



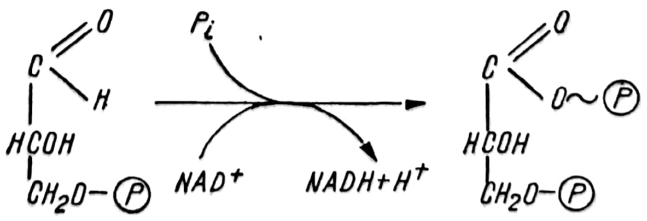
Enzima este aldolaza și reacția este ușor reversibilă.

(5) Cei doi triozofosfați, sub acțiunea unei izomeraze, se transformă reciproc unul în altul pînă la stabilirea unui echilibru:



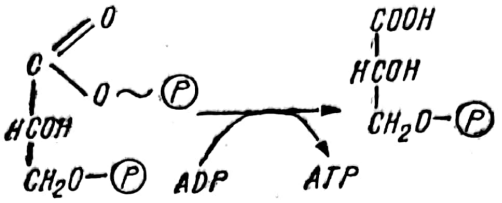
Gliceraldehida-3-P este cuprinsă într-o proporție mică în amestecul de echilibru (sub 10%), totuși pentru că în reacțiile următoare se utilizează aldotrioza, echilibrul se deplasează continuu spre formarea acesteia, astfel încît cele două jumătăți ale moleculei de glucoză sînt ambele metabolizate ca gliceraldehidă-3-P.

(6) Odată cu această reacție, catalizată de gliceraldehidă-3-P dehidrogenază, începe degradarea oxidativă a catenei de atomi de carbon a glucozei și mobilizarea de energie. Oxidarea grupării aldehidice din gliceraldehidă-3-P face posibilă sinteza unei legături macroergice:



1,3-difosfoglicerat

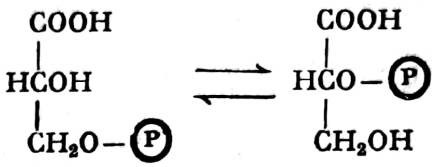
(7) Restul fosforil cu potențial chimic ridicat este transferat (de 1,3-difosfoglicerat kinază) pe ADP, rezultînd ATP.



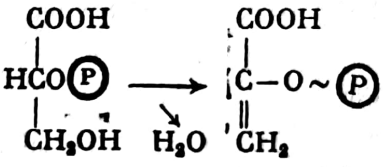
3-Fosfoglicerat

Reacțiile (6) și (7) constituie o fosforilare cuplată cu oxidare de substrat și a fost analizată sub acest aspect la Capitolul VIII, pag. 207.

(8) Sub acțiunea unei mutaze are loc izomerizarea 3-fosfogliceratului în 2-fosfoglicerat:

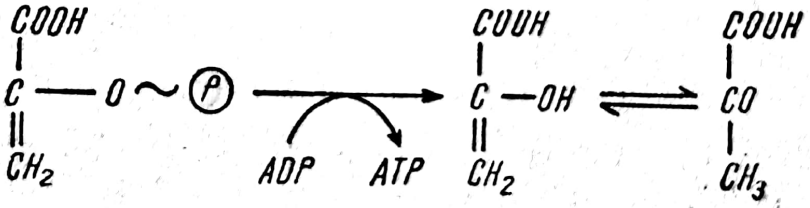


(9) Enolaza catalizează deshidratarea 2-fosfogliceratului și ridicarea potențialului chimic al legăturii fosforice care devine o legătură enol-fosforică:



Fosfoenolpiruvat

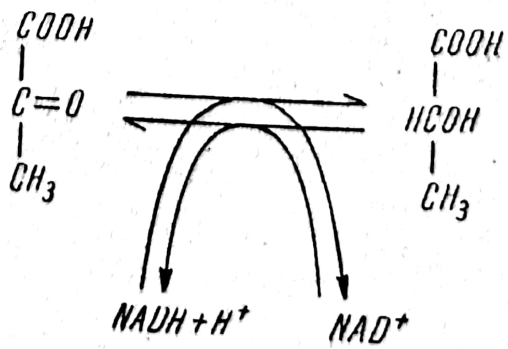
(10) Sub acțiunea unei kinaze (fosfoenolpiruvat kinaza) restul fosforil este transferat pe ADP, eliberîndu-se acidul piruvic:



Acid piruvic

Reacțiile (9) și (10) împreună constituie o nouă fosforilare prin care se obține ATP (vezi Cap. VIII, pag. 209).

(11) Lactat dehidrogenaza catalizează hidrogenarea reversibilă a acidului piruvic la acid lactic:



Scanned with OKEN Scanner

Echivalenţii reducători din NADH provin din etapa glicolitică precedentă (6), de oxidare a gliceraldehidei-3- P . Această oxidare intrasecvenţială a NADH-ului face glicoliza independentă de lanţul respirator şi de oxigen. Formarea acidului lactic în ţesuturi este condiţionată de hipoxie sau anoxie. Dacă ţesutul este bine aprovizionat cu oxigen, echivalenţii reducători din molecula de NADH parcurg lanţul respirator şi se combină cu oxigenul.

3.1.1. BILANŢUL ENERGETIC AL GLICOLIZEI

Glicoliza eliberează o cantitate relativ mică din energia chimică a glucozei ($\Delta G^{\circ\prime} = -47$ Kcal) deoarece produsul final — acidul lactic — este el singur un compus destul de complex. O parte din energia liberă furnizată de glicoliză este conservată şi utilizată pentru fosforilarea ADP-ului. Fiecare fragment a cîte trei atomi de carbon generează cîte două grupări $\sim$ P la nivelul celor două fosforilări cuplate, una cu oxidarea gliceraldehidei-3-fosfat şi cealaltă cu anhidrizarea 2-fosfo-gliceratului. Pentru o moleculă de glucoză degradată la acid lactic se obţin 4 molecule de ATP. Din acestea trebuie să se scadă cele două molecule de ATP consumate în reacţiile de fosforilare a hexozei (pînă la fructoză-1,6-difosfat). Rezultă că beneficiul energetic net al degradării glicolitice este de două molecule de ATP per moleculă de glucoză. Efectul energetic al glicolizei mai poate fi examinat calculîndu-se randamentul cu care celulele vii, conservă într-o formă utilă, energia mobilizată în acest proces. Din cele 47 Kcal de energie liberă care devin disponibile prin glicoliză sînt utilizate 14,6 Kcal (la sinteza a două legături fosfat macroergic) ceea ce înseamnă un randament de 31%. Acesta este mai mic decît randamentul de utilizare a energiei mobilizate prin arderea glucozei (40%).

3.1.2. IMPORTANŢA METABOLICĂ A GLICOLIZEI

Rolul principal al acestei căi degradative este sinteza de ATP. Este o cale oxidativă anaerobă şi este utilizată de celule în anoxie sau cînd aprovizionarea ţesuturilor cu oxigen este defectuoasă (hipoxie). Concentraţia oxigenului în ţesuturi reglează glicoza prin reoxidarea NADH-ului în lanţul respirator şi prin utilizarea ADP-ului în reacţii de fosforilare cuplate cu lanţul respirator.

Muşchii scheletici în cursul unor eforturi foarte intense şi de scurtă durată, cînd ţesutul este insuficient irigat şi oxigenat, utilizează numai glicoliza pentru a obţine ATP-ul necesar contracţiilor. Eritrocitele nu au mitocondrii şi un lanţ transportor de electroni şi pentru ele glucoza este unicul substrat energetic pe care îl pot folosi. Ţesuturile embrionare şi cele canceroase sînt şi ele caracterizate printr-o glicoliză intensă datorită funcţionării ineficiente a mecanismelor de coordonare a proceselor oxidative aerobe şi glicoliza anaerobă.

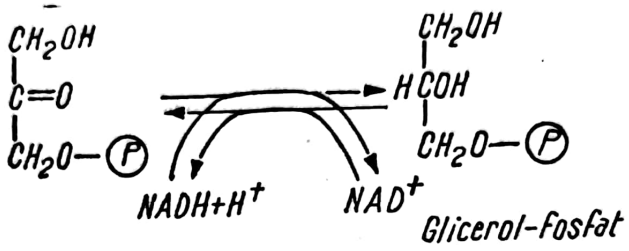
Unele dintre reacţiile glicolizei sînt reversibile pe cînd altele (reacţiile catalizate de hexokinază, fosfofructokinază şi fosfoenolpiruvat kinază) sînt ireversibile, fapt care face ca parcurgerea în sens invers a secvenţei Embden-Meyerhof să nu poată avea loc prin aceleaşi reacţii prin care se desfăşoară glicolitic. Mai departe se va vedea că prin ocolirea acestor reacţii ireversibile, are totuşi loc transformarea acidului lactic în glucoză.

Reacţiile secvenţei glicolitice pînă la acid piruvic sînt utilizate de celule şi în cursul degradării aerobe, complete a glucozei pînă la bioxid de carbon

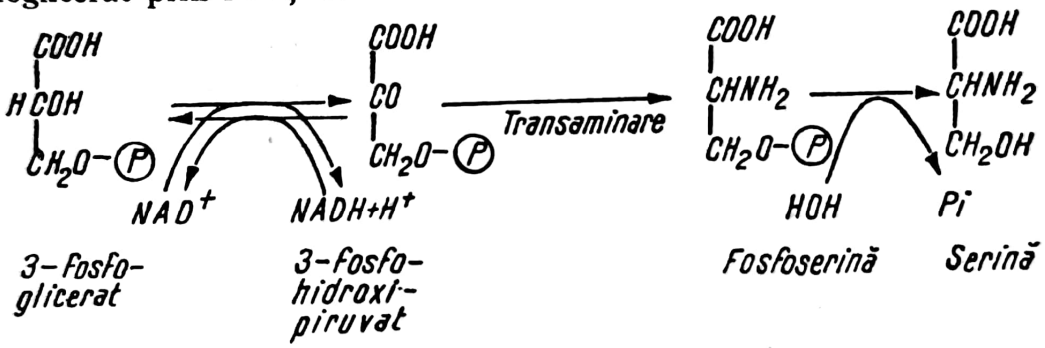
Scanned with OKEN Scanner

și apă. În acest caz pentru a se evita confuziile se folosește mai ales denumirea de secvență Embden-Meyerhof, înțelegîndu-se că sensul transformărilor nu este formarea de acid lactic care este termenul final al glicolizei, ci ele sînt doar etape intermediare într-un proces a cărui finalitate este oxidarea glucozei la bioxid de carbon și apă.

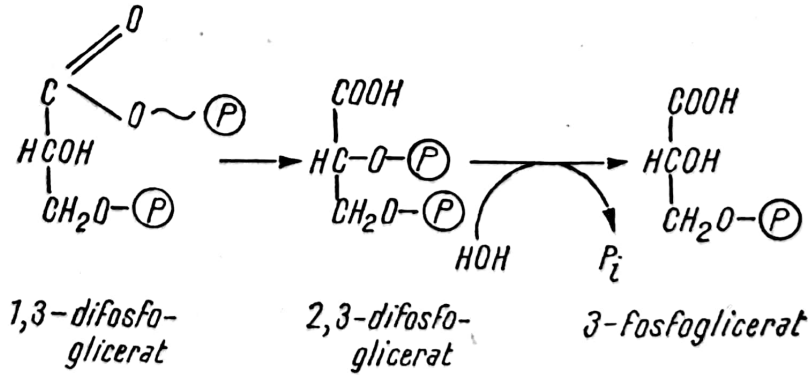
Pe lîngă rolul de mobilizare a energiei chimice înmagazinată în molecula de glucoză, secvența glicolitică mai are și rolul de a furniza precursori pentru alți componenți celulari glicerol-fosfat, aminoacizi. Glicerol-fosfatul servește la sinteză de trigliceride și alte categorii de lipide. El este obținut prin hidrogenarea dihidroxiacetono-fosfatului:



Catena hidrocarbonată sau ternară a unor aminoacizi neesențiali este furnizată de intermediari ai glicolizei. De exemplu, serina este obținută din 3-fosfoglicerat prin reacțiile:



În eritrocite funcționează un șunt al glicolizei prin care se obține 2,3-difosfogliceratul (2,3-DPG), reglator al afinității hemoglobinei pentru oxigen. Acest compus este obținut din 1,3-difosfoglicerat sub acțiunea unei mutaze și este descompus de o fosfatază la un alt metabolit al glicolizei:



Concentrația 2,3-difosfogliceratului în hematii este aproximativ echimolară cu a hemoglobinei. Compusul se fixează ionic de hemoglobină (HB A nu și de Hb F) în zona de contact a celor două subunități β. Prin legare de

2,3-difosfoglicerat are loc o tranziţie conformaţională şi afinitatea hemoglobinei pentru oxigen este diminuată. Hemoglobina se semisaturează cu oxigen la o presiune parţială a oxigenului mai mare în prezenţa acestui compus. Aceasta face ca la presiunea tisulară a oxigenului de 40 mm Hg şi în prezenţă de 2,3-difosfoglicerat hemoglobina să cedeze complet oxigenul transportat.

3.2. DEGRADAREA OXIDATIVĂ COMPLETĂ (ARDEREA) A GLUCOZEI PÎNĂ LA BIOXID DE CARBON ŞI APĂ

Energia chimică potenţială a glucozei este mobilizată complet prin oxidarea ei la bioxid de carbon şi apă, cale metabolică fundamentală pentru economia organismului. Reacţia globală, redată prin ecuaţia:

$$C_6H_{12}O_6 + 6\,O_2 \rightarrow 6\,CO_2 + 6\,H_2O$$

este puternic exergonică, ea mobilizează o cantitate mare de energie:

$$\Delta G^\circ = -686 \text{ Kcal}$$

Pe această cale se eliberează mult mai multă energie decît prin glicoliză ($\Delta G^{\circ\prime} = -47$ Kcal) şi cantitatea de ATP obţinută este de aproximativ 20 de ori mai mare decît aceea obţinută prin scindarea glucozei la acid lactic.

Aderea glucozei la bioxid de carbon şi apă are loc printr-un şir de reacţii succesive şi energia este eliberată în pachete care nu depăşesc valori mai mari

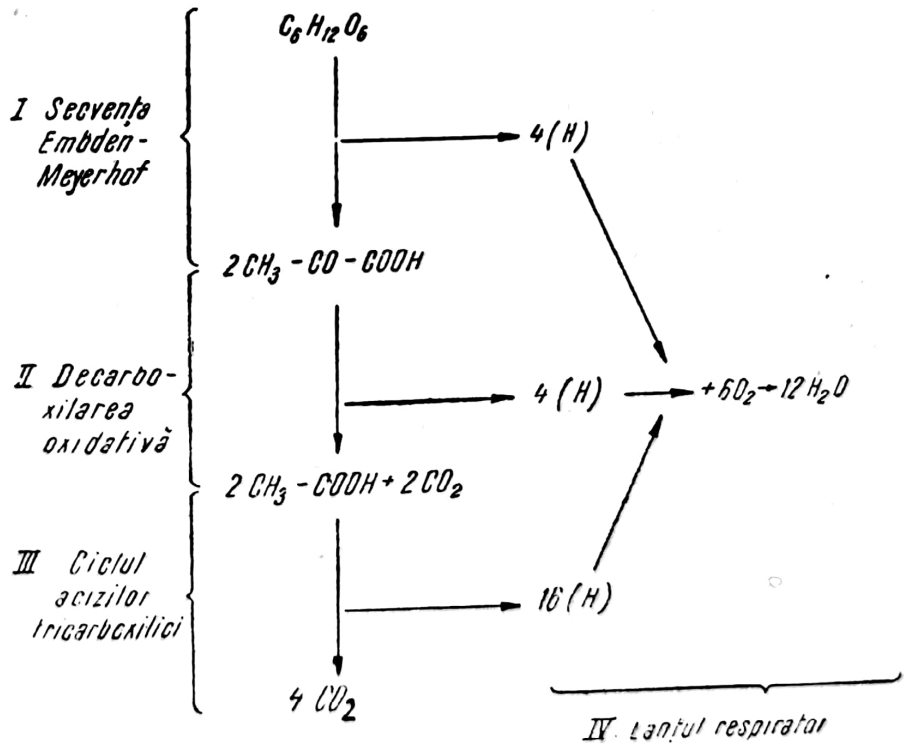


Fig. IX.2. Schema degradării oxidative a glucozei.

de 15—20 Kcal. Procesul trebuie analizat în patru mari etape fiecare dintre ele fiind constituită din mai multe reacţii individuale (fig. IX. 2). Prima etapă este reprezentată de secvenţa Embden-Meyerhof care se încheie cu formarea acidului piruvic. În etapa a doua acidul piruvic suferă o decarboxilare oxida-

Scanned with OKEN Scanner

tivă transformîndu-se în acid acetic şi bioxid de carbon. Urmează apoi secvenţa denumită ciclul acizilor tricarboxilici în care cei doi atomi de carbon din acidul acetic suferă un şir de oxidări pînă cînd sînt transformaţi în bioxid de carbon şi hidrogen labil. Atomii de hidrogen mobilizaţi în etapele I—III sînt colectaţi în lanţul respirator şi transferaţi oxigenului molecular. În fig. IX. 2 se arată schematic aceste patru etape subliniindu-se doar soarta atomilor de carbon şi de hidrogen. Este de remarcat că primele trei etape cuprind oxidări prin dehidrogenare şi doar în ultima etapă intervine oxigenul pentru a se combina cu hidrogenul mobilizat în etapele anterioare.

Se reiau acum aceste etape, pentru ca la sfîrşit să se revină la discutarea bilanţului energetic al procesului.

3.2.1. SECVENŢA EMBDEN-MEYERHOF

Această etapă cuprinde reacţiile secvenţei glicolitice pînă la acid piruvic. Deoarece NADH-ul rezultat prin oxidarea gliceraldehidei-3-fosfat nu este consumat la hidrogenarea acidului piruvic, el apare ca un produs final.

$$C_6H_{12}O_6 + 2\,NAD^+ \rightarrow 2\,CH_3-CO-COOH + 2\,NADH + 2\,H^+$$

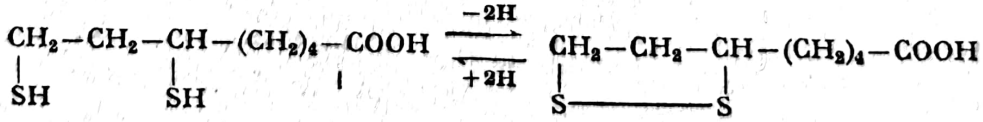
În această etapă au loc două fosforilări de substrat astfel că în bilanţul general mai trebuie să se ia în consideraţie cantitatea de ATP care se obţine pe calea Embden-Meyerhof.

3.2.2. DECARBOXILAREA OXIDATIVĂ A ACIDULUI PIRUVIC

În această etapă acidul piruvic suferă o reacţie de decarboxilare combinată cu una de oxidare dînd naştere la resturi acetil legate de coenzima A. Reacţia este catalizată de un complex multienzimatic, piruvat dehidrogenaza, analog aceluia care decarboxilează oxidativ α-cetoglutaratul. Piruvat dehidrogenaza este un agregat de mai multe enzime cu o astfel de aranjare tridimensională încît intervenţia lor se face succesiv, intermediarul format de o enzimă întîlneşte rapid centrul activ al enzimei următoare. În soluţie sînt eliberaţi numai produşii finali acetil-coenzima A şi NADH-ul. Ecuaţia globală a reacţiei este:

$$\text{acid piruvic} + NAD^+ + CoASH \rightarrow \text{acetil-CoA} + CO_2 + NADH + H^+$$

În afara coenzimelor libere — NAD^+ şi CoASH — complexul piruvat dehidrogenazic mai cuprinde tiamino-pirofosfat, acid lipoic şi FAD, care suferă transformări ciclice în cursul procesului. Acidul lipoic (acid 6,8-ditiooctanoic) există în două forme, oxidată şi redusă şi participă la etapa oxidativă a reacţiei:



Tiamino-pirofosfatul este coenzima implicată în reacţia de decarboxilare, iar FAD este transportul intermediar de hidrogen. Decarboxilarea oxidativă a acidului piruvic este reprezentată în fig. IX.3.

Acetil-CoA este un compus cu potenţial chimic ridicat, energia conservată în legătura sa macroergică provine din etapa oxidativă, de transformare

Scanned with OKEN Scanner

a unei grupări aldehidice în grupare carbonil. Această reacţie este analoagă decarboxilării oxidative a acidului α-cetoglutaric, examinată mai înainte (pag. 210) ca o fosforilare cuplată cu oxidare de substrat, cu deosebirea că energia legăturii tiolesterice din acetil-coenzimă nu poate fi utilizată pentru sinteză de ATP. Dar restul de acid acetic din acetil-CoA este activ chimic şi

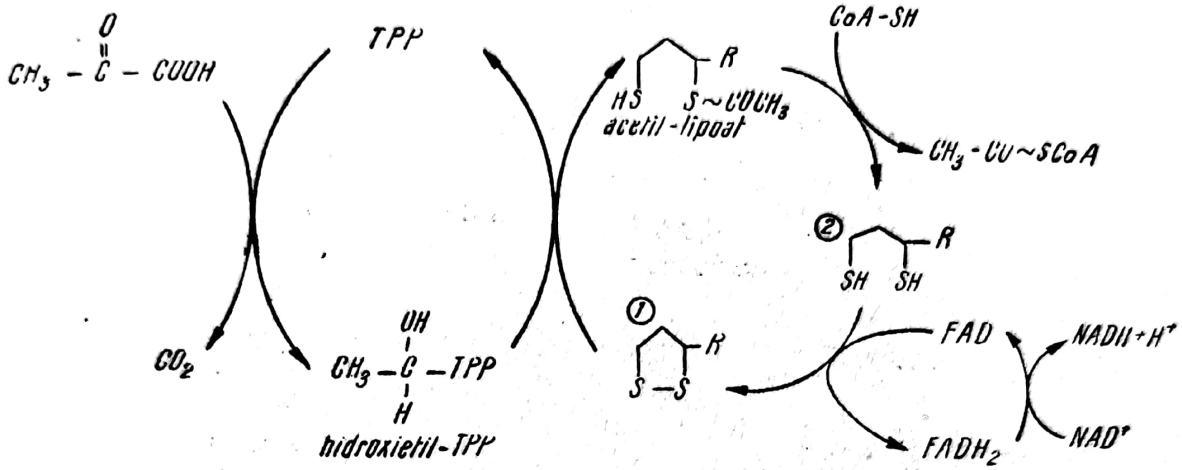


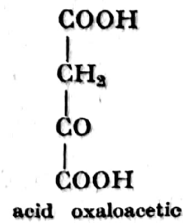
Fig. IX.3. Decarboxilarea oxidativă a acidului piruvic.

participă la numeroase reacţii metabolice. Din punct de vedere energetic mai trebuie ţinut seama că la decarboxilarea oxidativă a acidului piruvic se obţin atomi de hidrogen ce se vor combina cu oxigenul în etapa finală.

Transformarea acidului piruvic în acetil-CoA este ireversibilă şi această reacţie constituie un punct de control al dirijării piruvatului spre degradare oxidativă sau spre gluconeogeneză. Acetil-CoA este un efector negativ al piruvat dehidrogenazei şi prin aceasta β-oxidarea acizilor graşi, care produce cantităţi mari de acetil-CoA, frînează arderea glucozei. Ireversibilitatea reacţiei catalizate de complexul piruvat dehidrogenazic, explică neconvertibilitatea acizilor graşi în piruvat şi mai departe, în glucoză. De asemenea, fragmentele din catenele aminoacizilor care ajung sub formă de acetil-CoA nu pot da naştere la molecule noi de glucoză, deoarece nu pot depăşi acest punct.

3.2.3. CICLUL ACIZILOR TRICARBOXILICI

Acidul acetic — sub formă de acetil-CoA — este în continuare degradat oxidativ în ciclul acizilor tricarboxilici. Această secvenţă de reacţii mai poartă denumirea de ciclul Krebs, de la numele cercetătorului care a avut o contribuţie hotărîtoare la elucidarea secvenţei de reacţii şi a sensului ei metabolic. Restul $CH_3—CO—$ din acetil-CoA pătrunde în această cale metabolică condensîndu-se cu acidul oxaloacetic şi dînd naştere la acid citric (un acid tricarboxilic).



acid oxaloacetic

Printr-un şir de reacţii oxidative şi altele auxiliare grupul acetil este oxidat de bioxid de carbon şi atomi de hidrogen fixaţi pe coenzime. Molecula de acid oxaloacetic este recuperată integral. Se poate spune că oxaloacetatul îndeplineşte un rol asemănător cu al unui catalizator, o aceeaşi moleculă participînd la oxidarea a nenumărate molecule de acetil-CoA. Bineînţeles,

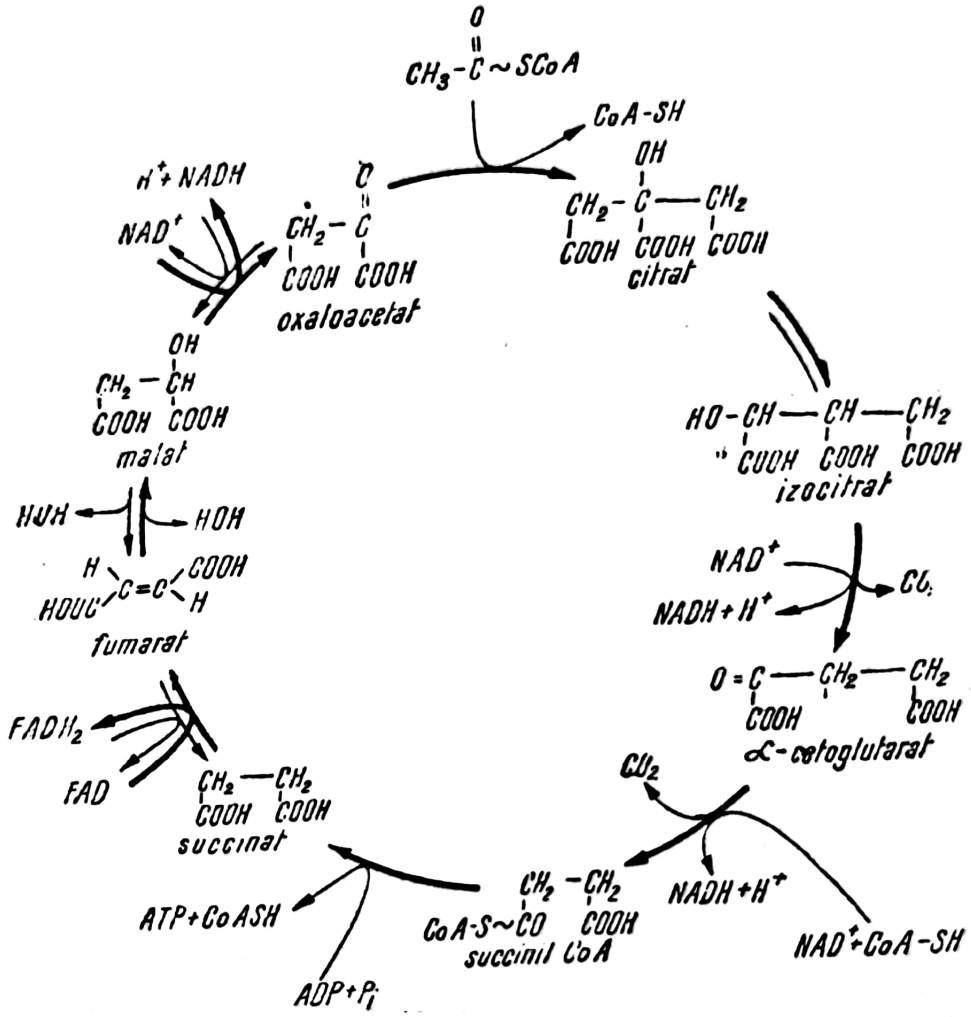
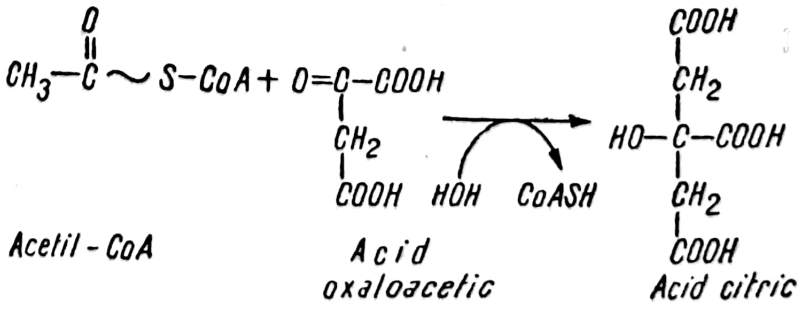


Fig. IX.4. Ciclul acizilor tricarboxilici.

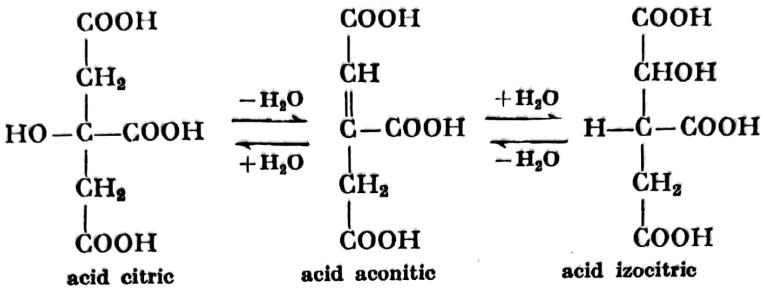
că nu trebuie considerat că exact atomii moleculei iniţiale de oxoaloacetat se află şi în molecula obţinută la capătul secvenţei, în cursul reacţiilor atomii restului acetil şi ai oxaloacetatului se amestecă. În fig. IX.4 este prezentată schema ciclului acizilor tricarboxilici. Reacţiile individuale sînt următoarele:

1) *Formarea acidului citric.* Ciclul de reacţii este iniţiat prin condensarea oxaloacetatului cu acetil-CoA, reacţie catalizată de citrat-sintetaza:

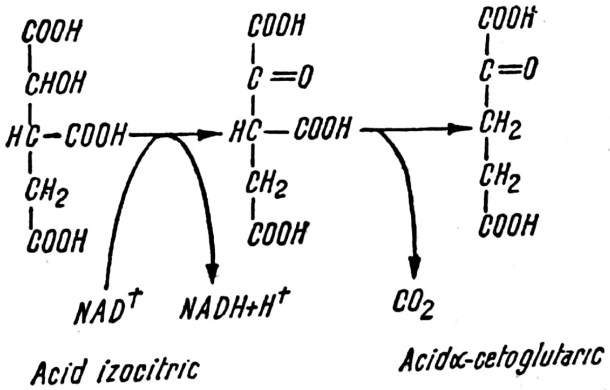


Reacţia este o condensare aldolică. Hidroliza legăturii tiolesterice macroergice furnizează energie liberă suficientă pentru ca reacţia să se desfăşoare uşor. Reacţia este ireversibilă.

2) *Izomerizarea acidului citric la acid izocitric.* Printr-o reacţie de hidratare reversibilă acidul citric este izomerizat la acid izocitric. Reacţia este catalizată de enzima aconitază.



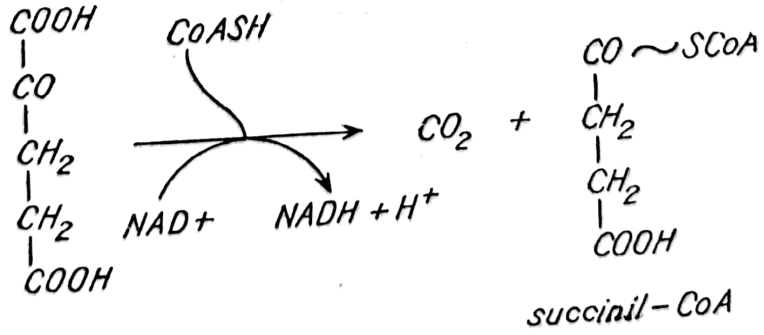
3) *Oxidarea acidului izocitric la acid α-cetoglutaric.* Aceasta este prima reacţie oxidativă a ciclului. Enzima — izocitrat dehidrogenaza — catalizează dehidrogenarea acidului izocitric dar produsul imediat al reacţiei este instabil şi se decarboxilează dînd naştere la acid α-cetoglutaric:



Această etapă este ireversibilă. Este totodată reacţia limitativă a ciclului acizilor tricarboxilici. Izocitrat dehidrogenaza este sensibilă la acţiunea unor efectori alosterici. Este activată de ADP şi AMP şi este inhibată de ATP.

4) *Decarboxilarea oxidativă a acidului α-cetoglutaric.* Această reacţie este cuplată cu sinteză de ATP şi a fost examinată sub acest aspect la fosforilările oxidative cuplate cu oxidări de substrat (Cap. VIII, pag. 210). Este singura reacţie a ciclului acizilor tricarboxilici în care se obţine imediat ATP.

Decarboxilarea oxidativă a acidului α-cetoglutaric — catalizată de un complex multienzimatic analog piruvat dehidrogenazei — se desfăşoară prin aceleaşi etape intermediare şi este descrisă de ecuaţia globală:

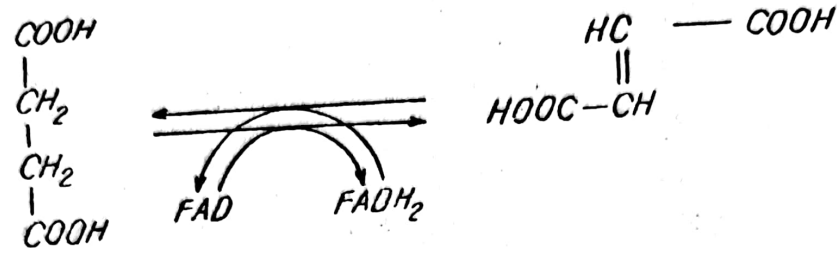


Legătura macroergică tiolesterică poate fi utilizată pentru sinteză de ATP prin reacţiile auxiliare:

$$\text{succinil}\sim\text{SCoA}+\text{GDP}+\text{P}_i \rightarrow \text{acid succinic}+\text{CoASH}+\text{GTP}$$

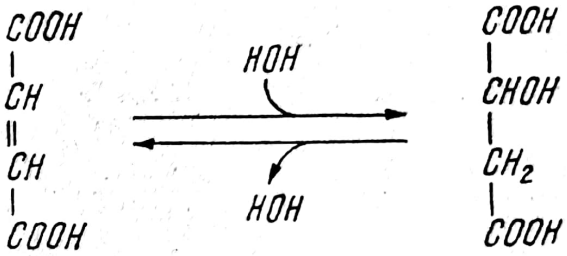
$$\text{GTP}+\text{ADP} \rightleftharpoons \text{GDP}+\text{ATP}$$

5) *Oxidarea acidului succinic la acid fumaric.* Această reacţie oxidativă a ciclului este catalizată de o flavoproteină, succinat dehidrogenaza, care funcţionează cu coenzima FAD:



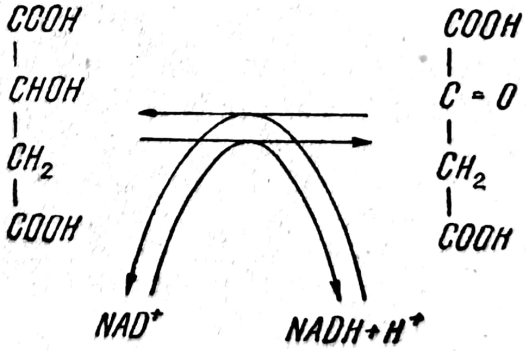
acid succinic — acid fumaric (trans.)

6) *Hidratarea acidului fumaric la acid malic.* Este o reacţie uşor reversibilă catalizată de fumaraza:



acid fumaric — acid malic

7) *Oxidarea acidului malic la acid oxaloacetic.* Malat dehidrogenaza care catalizează această reacţie funcţionează cu NAD; reacţia este uşor reversibilă:



Cu această reacţie în care se obţine o moleculă de acid oxaloacetic care a iniţiat şirul de transformări, ciclul acizilor tricarboxilici s-a încheiat.

Însumînd reacţiile parţiale ecuaţia globală a ciclului este:

$$\text{CH}_3-\overset{\overset{\text{O}}{\|}}{\text{C}}\sim\text{S}-\text{CoA}+3\,\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{CoASH}+2\,\text{CO}_2+8\,[\text{H}]$$

care scoate în evidenţă sensul lui metabolic: restul acetil a fost oxidat la CO_2 şi hidrogen. Cea mai mare parte a energiei libere mobilizată prin reacţiile ciclului este încă în stare potenţială, este cuprinsă în atomi de hidrogen

labilizaţi care vor furniza energie chimică utilă la combinarea lor cu oxigenul în lanţul respirator. În ciclul acizilor tricarboxilici are loc o singură fosforilare, cea cuplată cu decarboxilarea oxidativă a acidului α-cetoglutaric. Dacă adăugăm şi această reacţie la bilanţul general, obţinem ecuaţia:

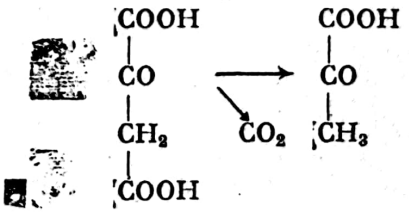
$$CH_3-\overset{\overset{O}{\|}}{C}\sim SCoA+2\,H_2O+ADP+P_i \rightarrow 2\,CO_2+ATP+CoASH+8\,[H]$$

Iar dacă se precizează şi natura coenzimelor care acceptă atomii de hidrogen în reacţiile de dehidrogenare, ecuaţia devine:

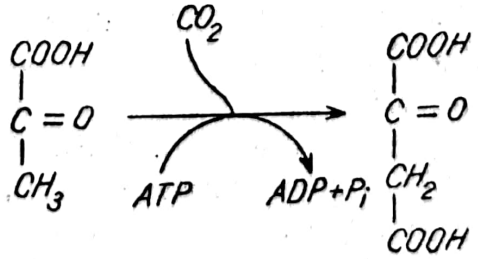
$$CH_3-\overset{\overset{O}{\|}}{C}\sim SCoA+2\,H_2O+3\,NAD^+ + ATP + ADP + P_i \rightarrow$$
$$\rightarrow 2\,CO_2+3\,NADH+3\,H^+ + FADH_2 + ATP + CoASH$$

Reacţiile ciclului acizilor tricarboxilici se desfăşoară în mitocondrii, etapele lui oxidative alimentează lanţul respirator cu atomi de hidrogen, transportaţi atît sub formă de NADH cît şi ca $FADH_2$. Cele două procese, ciclul acizilor tricarboxilici şi lanţul respirator, sînt interdependente. Ciclul acizilor tricarboxilici este tributar lanţului respirator, pentru regenerarea continuă a codehidrogenazelor care vehiculează atomii de hidrogen. În ecuaţia globală care însumează reacţiile ciclului acizilor tricarboxilici oxigenul nu figurează printre reactanţi, însă acest şir de reacţii nu poate avea loc decît în condiţii de aerobioză cînd se asigură concentraţiile corespunzătoare ale coenzimelor transportoare de hidrogen.

Funcţionarea ciclului acizilor tricarboxilici şi debitul său, sînt condiţionate de disponibilităţile celulelor în acid oxaloacetic. Cu cît concentraţia acetil-CoA este mai mare, cu atît este necesară o concentraţie mai mare de acid oxaloacetic pentru ca mai multe molecule de acetil-CoA să pătrundă în ciclu. Celulele au posibilitatea de a-şi regla conţinutul în acid oxaloacetic după necesităţi. Cînd nevoile sînt mici excesul de acid oxaloacetic este transformat prin decarboxilare în acid piruvic:



Din contră, cînd acidul oxaloacetic se află într-o cantitate insuficientă în raport cu cantitatea de acetil-CoA care aşteaptă să fie degradată, atunci are loc sinteza de acid oxaloacetic din acid piruvic, prin carboxilare. Reacţia în acest sens este endergonică şi are loc cu consum de ATP. Enzima care catalizează reacţia este piruvat carboxilaza, care cuprinde biotină în centrul activ. O legătură fosfat macroergică din ATP este utilizată pentru activarea bioxidului de carbon:



Scanned with OKEN Scanner

Activitatea piruvat carboxilazei este obligatoriu dependentă de prezența acetil-CoA care este un efector alosteric pozitiv al acestei enzime. Prin această proprietate celulele au capacitatea de a controla foarte fin cantitatea de acid oxaloacetic în vederea reglării debitului ciclului acizilor tricarboxilici. Fapt remarcabil, însăși substratul ciclului joacă rolul de metabolit reglator controlîndu-și singur viteza propriei sale degradări.

O altă modalitate de a obține oxaloacetat se realizează prin pătrunderea în ciclul acizilor tricarboxilici a α-cetoglutaratului și a oxaloacetatului obținuți din glutamat și respectiv din aspartat prin transaminare. Cetoglutaratul parcurge un segment din secvența de reacții a ciclului și generează o moleculă de oxaloacetat. Aspartatul prin transaminare formează direct oxaloacetat.

Ciclul acizilor tricarboxilici este o etapă degradativă și pentru alte substanțe energetice celulare. În primul rînd degradarea acizilor grași prin β-oxidare duce la formarea a cîte unei molecule de acetil-CoA pentru fiecare pereche de atomi de carbon ai acidului gras. Acetil-CoA astfel formată urmează aceeași cale de degradare, prin ciclul acizilor tricarboxilici și lanțul respirator, ca și moleculele rezultate din glucoză. De asemenea, unii aminoacizi sînt transformați, în totalitate sau parțial, în acetil-CoA care urmează aceeași cale. Ciclul acizilor tricarboxilici este deci etapa finală comună pentru degradarea oxidativă a principalilor constituenți celulari: glicide, grăsimi, proteine.

Ciclul acizilor tricarboxilici în întregime nu poate fi parcurs în sens invers, ceea ce ar echivala cu reconstituirea unei molecule de acid acetic (sau de acetil-CoA) din bioxid de carbon, apă și hidrogen. Unele reacții ale ciclului sînt însă ușor reversibile, ele au loc în ambele sensuri pe aceeași cale (de exemplu: interconversiunea malat $\rightleftharpoons$ fumarat). În schimb, altele sînt ireversibile, ca oxidarea izocitratului la acid α-cetoglutaric și decarboxilarea acestuia din urmă în acid succinic.

Ciclul acizilor tricarboxilici poate îndeplini în celule și un rol anabolic. Intermediarii ciclului pot fi scoși din circuitul normal pentru a fi utilizați în secvențe biosintetice. De exemplu, acidul succinic este precursorul nucleului profirinic din hem. Acizii oxaloacetic și α-cetoglutaric furnizează catena hidrocarbonată a acizilor aspartic și glutamic, aminoacizi constituenți ai majorității proteinelor. Prin urmare aceasta este o modalitate prin care glucoza și alte glucide servesc la sinteza de proteine.

3.2.4. OXIDAREA HIDROGENULUI ÎN LANȚUL RESPIRATOR

Degradarea completă a glucozei este definitiv încheiată cu etapa de oxidare a hidrogenului în lanțul respirator și sinteza cuplată cu ATP. Atomii de hidrogen fixați pe coenzime, sub formă de NADH și $FADH_2$ parcurg sistemele redox ale lanțului respirator, combinîndu-se în final cu oxigenul. Echivalenții reducători aduși de NADH sînt introduși în lanțul respirator la nivelul NADH dehidrogenazei. Energia mobilizată în căderea lor în lungul gradientului de potențial este înmagazinată în ATP în trei puncte de fosforilare. Atomii de hidrogen transportați de FAD (coenzima succinat dehidroge-

Scanned with OKEN Scanner

nazei) pătrund în lanțul respirator la nivelul coenzimei Q și în drumul lor spre oxigen trec numai prin două puncte de fosforilare:

$$NADH + H^+ + \tfrac{1}{2}O_2 + 3\,ADP + 3\,P_i \rightarrow NAD^+ + 3\,ATP + 4\,H_2O$$

și

$$FADH_2 + \tfrac{1}{2}O_2 + 2\,ADP + 2\,P_i \rightarrow FAD + 2\,ATP + 3\,H_2O$$

3.2.5. BILANȚUL ENERGETIC GLOBAL AL DEGRADĂRII OXIDATIVE A GLUCOZEI

Ecuația globală a procesului este:

$$C_2H_{12}O_6 + 6\,O_2 \rightarrow 6\,CO_2 + 6\,H_2O$$

$$\Delta G^{\circ\prime} = -686 \text{ Kcal.}$$

Pentru a se stabili ce fracțiune din energia liberă mobilizată în acest proces este conservată într-o formă utilă celulelor și ce fracțiune se pierde în mediu sub formă de căldură, este util să se calculeze cantitatea de energie încorporată în legăturile macroergice din ATP.

Fosforilările cuplate cu oxidări de substrate conduc la sinteza unui număr mic de molecule de ATP. În secvența Embden-Meyerhof au loc două fosforilări pentru fiecare fragment de cîte trei atomi de carbon. O a treia fosforilare a ADP-ului, cuplată cu oxidarea unui substrat, are loc în ciclul acizilor tricarboxilici (la decarboxilarea oxidativă a acidului α-cetoglutaric). Cele două molecule de acetil-CoA care rezultă dintr-o moleculă de glucoză generează în această reacție două molecule de ATP. În total, prin fosforilări cuplate cu oxidări de substrate o moleculă de glucoză generează 6 molecule de ATP.

Cea mai mare parte din ATP-ul obținut prin arderea glucozei în organism se formează prin fosforilări oxidative cuplate cu lanțul respirator. Dehidrogenările catalizate de gliceraldehidă-3-fosfat, piruvat, izocitrat, malat și α-cetoglutarat dehidrogenază furnizează fiecare cîte o moleculă de NADH pentru o jumătate moleculă de glucoză. O moleculă de glucoză va genera 10 molecule de NADH a căror oxidare în lanțul respirator va fi cuplată cu sinteza a $10 \times 3 = 30$ molecule de ATP. În ciclul acizilor tricarboxilici are loc o dehidrogenare catalizată de o flavoproteină (succinat dehidrogenaza) și această pereche de atomi de hidrogen generează în lanțul respirator numai două molecule de ATP. Dublînd pentru cele două molecule de acetil-CoA, rezultă pe această cale 4 molecule de ATP.

Beneficiul total în molecule de ATP al arderii glucozei este:

6 molecule ATP prin fosforilări cuplate cu oxidare de substrat
30 molecule ATP prin fosforilări cuplate cu oxidarea NADH-ului în lanțul respirator;
4 molecule ATP prin fosforilări cuplate cu oxidarea $FADH_2$ în lanțul respirator.

Total: 40 molecule ATP

Beneficiul net este mai mic deoarece în etapele inițiale se cheltuiesc două legături macroergice ale ATP-ului pentru fosforilarea glucozei pînă la hexozo-1,6-difosfat. Prin urmare, arderea la bioxid de carbon și apă a unei molecule de glucoză este cuplată cu sinteza a 38 molecule de ATP, ceea ce echivalează cu conservarea a 277 Kcal energie chimică utilă. Randamentul de utilizare a energiei mobilizate, de aproximativ 40%, întrece eficiența cu care este

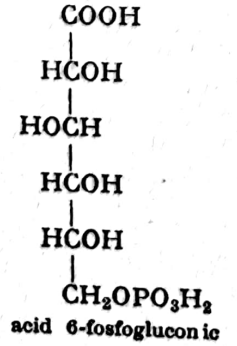
Scanned with OKEN Scanner

conservată energia chimică mobilizată prin glicoliză. În acest ultim caz, randamentul este de numai 30%. Prin urmare, arderea glucozei este un proces mai economic decît degradarea sa la acid lactic. O celulă cînd utilizează calea glicolitică degradează 19 molecule de glucoză pentru a obţine aceeaşi cantitate de ATP pe care o poate obţine dintr-o singură moleculă de glucoză oxidată pînă la bioxid de carbon şi apă.

Ce factori determină degradarea glucozei pînă la acid lactic sau pînă la bioxid de carbon şi apă? Bineînţeles, în absenţa oxigenului numai degradarea glicolitică este posibilă; totuşi oxigenul nu intervine direct ca metabolit reglator; ţesuturi aerate în mod egal pot avea consumuri de oxigen (activităţi respiratorii) foarte diferite. Intensitatea activităţii metabolice, nevoile energetice celulare sînt factorii esenţiali care determină viteza de curgere a metaboliţilor prin etapele degradative mobilizatoare de energie. Reacţiile de dehidrogenare sînt condiţionate de prezenţa coenzimelor acceptoare de hidrogen iar fluxul de electroni prin lanţul respirator necesită prezenţa ADP-ului, acceptorul fosfatului macroergic generat în lanţul respirator. Utilizarea rapidă a ATP-ului generează ADP care accelerează fluxul de electroni prin lanţul respirator şi descarcă de hidrogen coenzimele reduse, care la rîndul lor stimulează dehidrogenările. Cînd se acumulează ATP are loc secvenţa inversă: prin lipsa acceptorului de fosfat macroergic activitatea lanţului respirator este redusă şi coenzimele rămîn încărcate cu hidrogen ceea ce scade viteza reacţiilor de dehidrogenare. Alături de acest control global al arderii glucozei, care funcţionează în raport cu cererea şi oferta de energie, secvenţele Embden-Meyerhof şi ciclul acizilor tricarboxilici au puncte de control sensibile la fluctuaţiile concentraţiilor unor agenţi reglatori. Prin aceste mecanisme fiecare etapă este reglată foarte fin în funcţie de diverşi parametri. Acest reglaj fin este cu atît mai necesar cu cît secvenţa Embden-Meyerhof şi ciclul acizilor tricarboxilici pe lîngă mobilizare de energie îndeplinesc şi alte roluri, unele anabolice.

3.3. CALEA FOSFOGLUCONATULUI (CALEA PENTOZ O-FOSFAŢILOR)

Aceasta este o cale alternativă de degradare a glucozei, de fapt a glucozo-6-fosfatului şi denumirea de calea fosfogluconatului provine de la prima reacţie a secvenţei în care glucozo-6-fosfatul este oxidat la 6-fosfogluconat. Această cale mai este cunoscută şi sub numele de calea sau ciclul pentozo-fosfaţilor deoarece în secvenţă apar ca produşi intermediari esterii fosforici ai unor pentoze. O altă denumire este aceea de calea oxidativă directă întrucît reprezintă o modalitate de oxidare a glucozei la bioxid de carbon care ocoleşte secvenţa Embden-Meyerhof şi ciclul acizilor tricarboxilici.



acid 6-fosfogluconic

Calea fosfogluconatului cuprinde două mari etape:

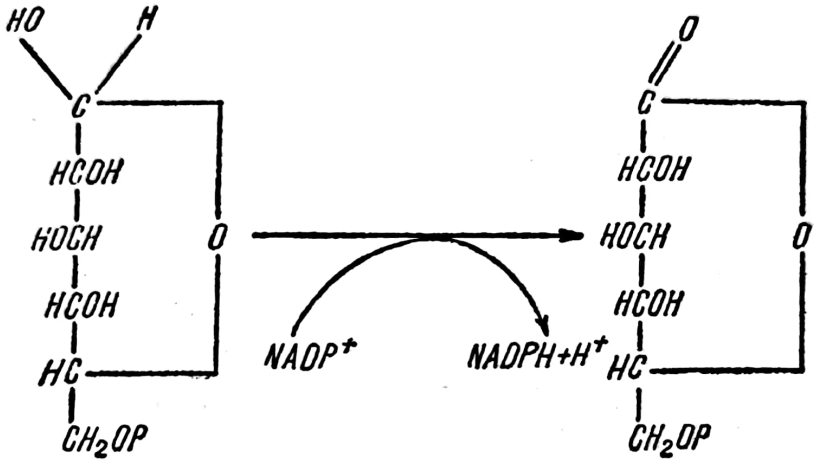
a) O etapă oxidativă în care atomul C_1 al glucozo-6-fosfatului este oxidat la bioxid de carbon, iar fragmentul care cuprinde atomii C_2—C_6 ai moleculei iniţiale de glucoză dă naştere la o moleculă de pentoză-5-fosfat.

b) O a doua etapă în care are loc conversiunea pentozo-fosfaţilor în glucoză-6-fosfat. Pentru a obţine 6 molecule de bioxid de carbon, ceea ce echivalează cu oxidarea completă a unei molecule de glucoză, calea fosfo-

Scanned with OKEN Scanner

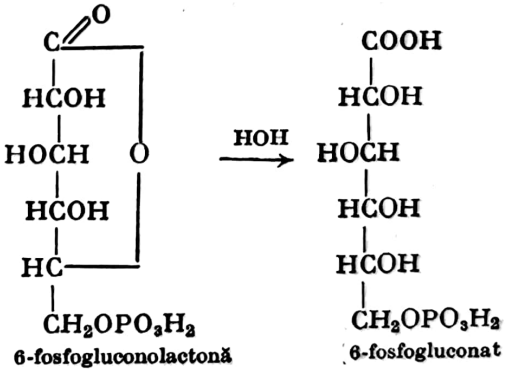
gluconatului trebuie parcursă de şase ori, considerîndu-se că pentozele nu sînt derivate pe alte căi metabolice. De fapt, o cantitate mai mare sau mai mică de pentoze sînt utilizate ca atare pentru sinteză de nucleotide şi de acizi nucleici.

Etapa oxidativă. Glucoza este metabolizată pe această cale sub forma esterului ei fosforic, glucozo-6-fosfat. Prima reacţie oxidativă a secvenţei este oxidarea grupării —CHO la COOH catalizată de glucozo-6-fosfat dehidrogenază. Se obţine acidul 6-fosfogluconic sub formă de ester intern, lactonă. Coenzima acceptoare de hidrogen este $NADP^+$-ul:



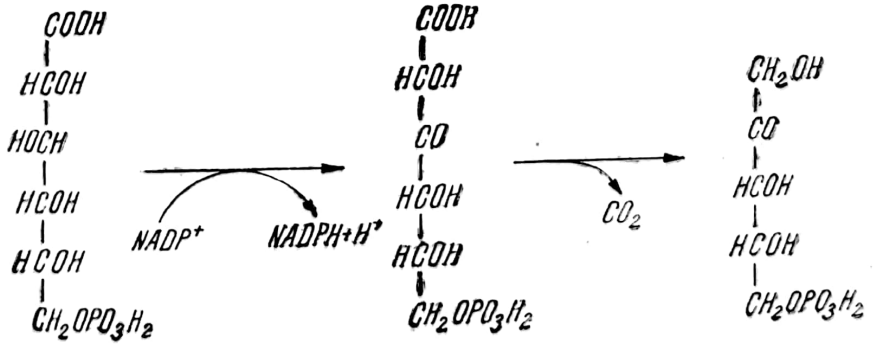
β-glucoză-6-Ⓟ *6-fosfo-gluconolactonă*

Lactona este apoi hidrolizată (enzimatic) la acid 6-fosfogluconic:



6-fosfogluconolactonă 6-fosfogluconat

Acum urmează a doua reacţie oxidativă, care oxidează gruparea alcoolică de la C_3 la grupare carbonil. Produsul imediat al oxidării este instabil, el suferă o decarboxilare în urma căreia rezultă o pentoză, respectiv, ribuloză-5-fosfat. Enzima care catalizează reacţia — 6-fosfogluconat-dehidrogenaza — transferă echivalenţii reducători pe $NADP^+$:

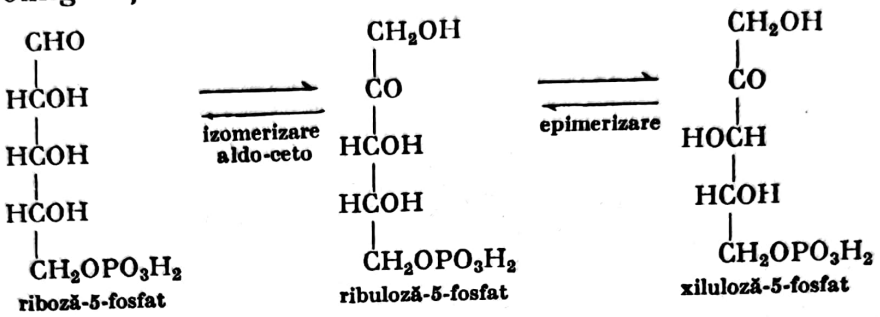


6-fosfogluconat *ribuloză-5-fosfat*

Bilanțul acestei etape oxidative este oxidarea unei grupări $-C\overset{O}{\underset{H}{<}}$ a glucozei la bioxid de carbon și obținerea a două perechi de atomi de hidrogen labil sub formă de NADPH:

$$\text{glucoză-6-P} + 2\,\text{NADP}^+ + \text{HOH} \rightarrow \text{CO}_2 + \text{pentoză-5-}\textcircled{P} + 2\text{NADPH} + 2\text{H}^+$$

Utilizarea pentozofosfaților. Ribuloza-5-fosfat, produsul etapei oxidative, se poate izomeriza fie într-o aldoză, fie într-o cetopentoză epimeră prin modificarea configurației carbonului asimetric C-3:



Aceste pentoze care cuprind atomii C_2—C_6 ai moleculelor inițiale de glucoză, pot fi convertite integral în glucoză-6-fosfat (fig. IX.5). Din 6 molecule de pentoză se obțin cinci molecule de hexoză fosforilată:

$$6\ \text{pentozo-5-fosfat} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow 5\ \text{glucozo-6-fosfat} + \text{P}_\text{i}$$

Dacă pentozele sînt transformate integral în hexoză, calea fosfogluconatului reprezintă o modalitate de oxidare directă a glucozei la bioxid de carbon și NADPH. Prin însumarea reacțiilor parțiale ale celor două etape obținem ecuația globală:

$$\text{glucozo-6-P} + 7\text{H}_2\text{O} + 12\text{NADP}^+ \rightarrow 6\text{CO}_2 + 12\text{NADPH} + 12\text{H}^+ + \text{P}_\text{i}$$

Semnificația metabolică a căii pentozo-fosfaților. Sensul metabolic al acestui proces oxidativ nu este însă mobilizarea energiei chimice deoarece NADPH-ul nu interacționează direct cu lanțul respirator. Cei doi echivalenți reducători, un atom de hidrogen și un electron, cuprinși într-o moleculă de NADPH sînt utilizați de către celule pentru reacții de biosinteză care, spre deosebire de reacțiile degradative oxidative, sînt procese reductive. Calea fosfogluconatului se desfășoară în citosol, tocmai în compartimentul unde au loc principalele reacții de biosinteză. Pe de altă parte, enzimele specifice acestei căi metabolice, în primul rînd glucozo-6-fosfat dehidrogenaza care catalizează reacția limitantă de viteză a secvenței, se află în acele țesuturi care consumă cantități mari de NADPH pentru sinteză de acizi grași, de steroizi. Ficatul, cu o activitate metabolică complexă, glanda mamară în perioada de lactație cînd sintetizează cantități mari de grăsimi, glandele sexuale și cortexul suprarenalei care sintetizează steroizi, sînt țesuturile unde calea fosfogluconatului este cea mai activă. În mușchi, unde nu au loc biosinteze reductive de acizi grași, de steroizi, activitatea glucozo-6-fosfat dehidrogenazei este foarte

Scanned with OKEN Scanner

redusă. În eritrocit calea fosfogluconatului, cel puţin etapa sa oxidativă, este foarte activă întrucît în aceste celule NADPH-ul joacă un rol important în menţinerea integrităţii membranei celulare. Persoanele care prezintă o insuficienţă eritrocitară (ereditară sau dobîndită) în enzima glucozo-6-fosfat dehidrogenază au hematii foarte sensibile la hemoliză.

Pentozo-fosfaţii care rezultă în etapa oxidativă a căii fosfo-gluconatului sînt utilizaţi parţial, ca atare, în reacţii metabolice. În această privinţă o

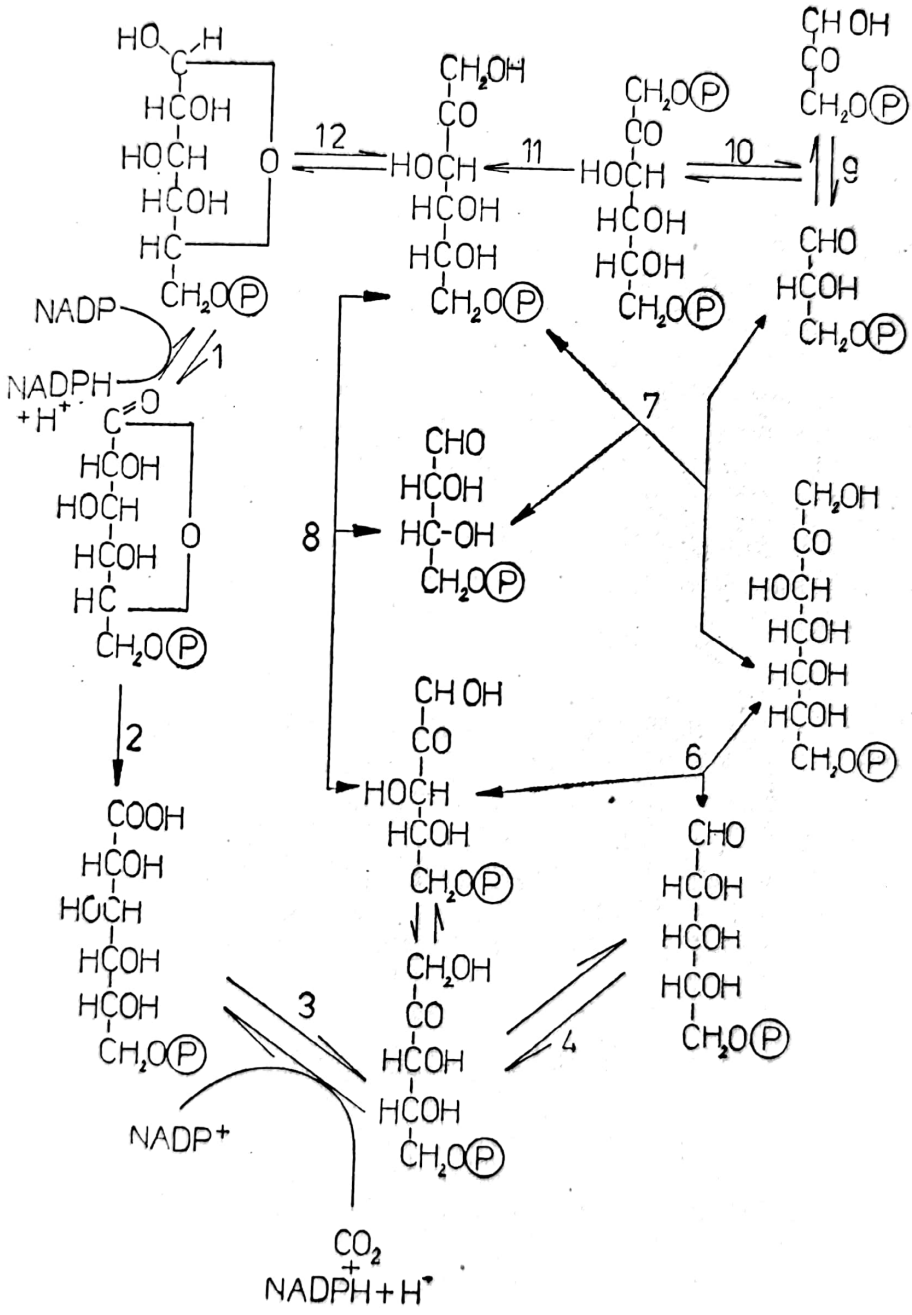


Fig. IX.5. Calea pentozo-fosfaţilor.

Enzimele care intervin sînt: glucoză-6-P dehidrogenaza (1), lactonază (2), 6-fosfogluconat dehidrogenază (3), riboză-5-P izomerază (4), ribuloză-5-P epimerază (5), transcetolază (6 şi 8), transaldolază (7), triozo-fosfat izomerază (9), aldolază (10), fructoză-1,6-fosfatază (11) şi fructoză-6-P izomerază (12).

Scanned with OKEN Scanner

importanţă deosebită prezintă utilizarea ribozo-5-fosfatului la sinteza de nucleotide, unităţile structurale ale acizilor nucleici.

În concluzie, această cale metabolică furnizează organismului în primul rînd atomi de hidrogen cu un potenţial chimic ridicat, sub formă de NADPH, necesar sintezelor reductive şi în al doilea rînd permite transformarea glucozei în riboză şi dezoxiriboză, componentele glucidice ale nucleotidelor şi ale acizilor nucleici.

4. METABOLISMUL GLICOGENULUI

Glicogenul reprezintă pentru organism forma de depozitare a rezervelor glucidice. Glicogenul cuprins în celelalte ţesuturi, în afară de muşchi şi de ficat, constituie o mică fracţiune a acestei rezerve. La un bărbat adult (de 70 kg) bine hrănit, rezerva de glicogen hepatic este de aproximativ 100 g, iar glicogenul din muşchii scheletici se ridică la aproximativ 250 g. Dacă la această cantitate se adaugă cele 10 g de glucoză din lichidele extracelulare rezultă că rezervele de glucide ale organismului asigură cca 1 500 Kcal. Deşi rezervele de glicogen sînt reduse în comparaţie cu depozitele energetice ale organismului sub formă de grăsimi (100 000 Kcal) şi de proteine (25 000 Kcal), totuşi prin dinamismul şi mobilitatea lor, ele joacă un rol fundamental în metabolismul energetic celular.

Metabolismul glicogenului implică două procese contrarii:

a) glicogenoliza — liberarea resturilor glucozil din molecula polizaharidului, şi

b) glicogenogeneza sau glicogeneza — reunirea resturilor glucozil în lanţurile amilozice ale glicogenului. Sinteza şi degradarea glicogenului au loc pe căi deosebite care sînt reglate interdependent şi complementar, astfel că atunci cînd una din căi este operantă cealaltă este blocată. Acest mod de reglare prezintă avantaje importante pentru organism.

Glicogenul este un polizaharid cu o structură arborescentă, resturile glicozil sînt reunite prin două tipuri de legături α-(1→4)- şi α-(1→6)-glicozidice. Legăturile 1→4 sînt cele mai numeroase, iar formarea şi ruperea lor este supusă controlului metabolic şi hormonal.

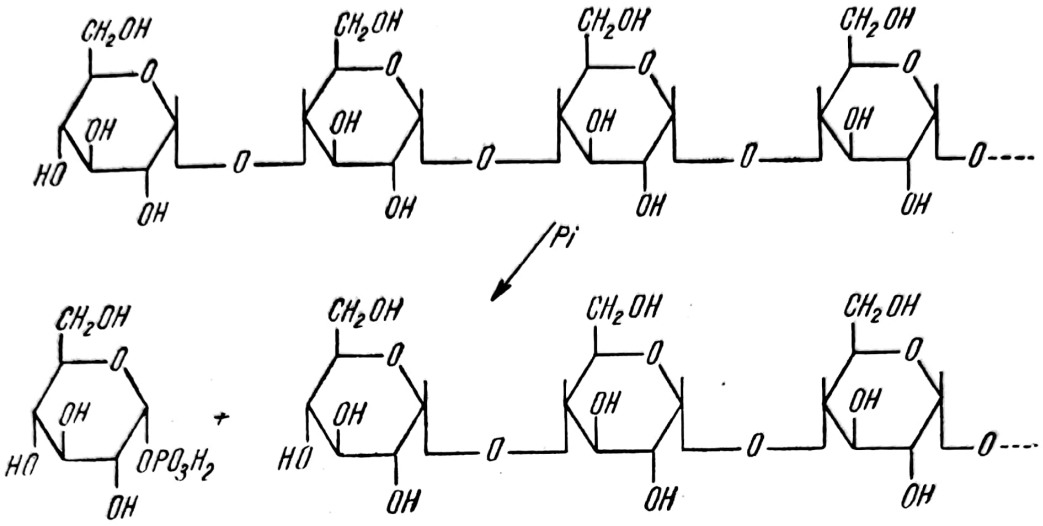
4.1. GLICOGENOLIZA

În acest proces sînt rupte legăturile glicozidice dintre resturile de glucoză şi produsul principal al reacţiei este glucozo-1-fosfatul (93%). Într-o cantitate foarte mică prin glicogenoliză se formează şi glucoză liberă (7%). La degradarea glicogenului participă două enzime, glicogen fosforilaza şi enzima de deramificare, enzime cu acţiuni specifice pentru cele două tipuri de legături glicozidice.

Glicogen fosforilaza este o transferază care mediază transferul de resturi glicozil de la capetele nereducătoare ale lanţurilor amilozice la acid fosforic formîndu-se glucozo-1-fosfat. Prin analogie cu o reacţie de hidroliză, acesteia i se spune fosforoliză, elementele acidului fosforic scindează legătura glico-

Scanned with OKEN Scanner

zidică, întocmai cum în cazul unei reacţii hidrolitice elementele apei rup legătura respectivă. Acţiunea glicogen fosforilazei poate fi redată astfel:



Prin acţiunea fosforilazei sînt detaşate succesiv resturi glicozil de la capetele lanţurilor amilozice. Acţiunea enzimei încetează în vecinătatea unei ramificaţii cuprinzînd patru resturi glucozil. Urmează intervenţia unei transferaze care transportă un trizaharid la extremitatea unei alte ramificaţii expunînd restul glucozil fixat prin legătura (1→6)-glucozidică acţiunii enzimei de deramificare (amilo-1→6-glucozidază). Prin scindarea hidrolitică a legăturii se formează glucoză liberă. După îndepărtarea catenei laterale de la lanţul amilozic este din nou posibilă intervenţia fosforilazei. Acţiunile celor trei enzime — fosforilaza, glucantransferaza şi amilo-1→6-glicozidaza — sînt redate în fig. IX.6. Prin acţiunea alternativă a fosforilazei şi a enzimei de deramificare glicogenul poate fi degradat în totalitate. Se crede că in vivo dislocarea sa în unităţi glucozil nu este completă, rămînînd totdeauna un nucleu ce cuprinde cîteva ramificaţii şi care în condiţii potrivite va servi ca primer la reconstituirea glicogenului.

În afară de această cale principală de degradare a glicogenului — cale fosforolitică — în diverse ţesuturi ale mamiferelor au fost evidenţiate activităţi enzimatice care atacă hidrolitic legăturile α-(1→4)-glicozidice din molecula glicogenului. O astfel de enzimă este α-glucozidaza lisosomală care detaşează hidrolitic glucoza din lanţurile externe ale glicogenului. Într-o maladie ereditară în care această enzimă este absentă lisosomii celulelor se încarcă cu glicogen (glicogenoză generalizată). O altă reacţie hidrolitică de degradare intracelulară a glicogenului are loc prin intermediul unei α-amilaze. Această enzimă rupe legăturile 1→4-glicozidice din interiorul lanţurilor lineare amilozice scindînd molecula glicogenului în fragmente mai mici. Prin această reacţie se multiplică moleculele „primer" de glicogen, sinteza polizaharidului devenind mult mai eficientă.

Reglarea hormonală a glicogenolizei. Glicogenoliza este un proces prin care sînt mobilizate rezervele glucidice ale organismului şi se află sub control hormonal. Principalii hormoni care îndeplinesc acest rol sînt adrenalina şi glucagonul. Glucagonul se deosebeşte de adrenalină prin aceea că el nu acţio-

Scanned with OKEN Scanner

nează la nivelul mușchilor ci numai în ficat. Adrenalina are acțiune glicogenolitică atît în ficat cît și în mușchi.

Controlul hormonal al glicogenolizei se realizează prin modularea activității fosforilazei. Fosforilazele au fost obținute în stare pură din țesuturi de

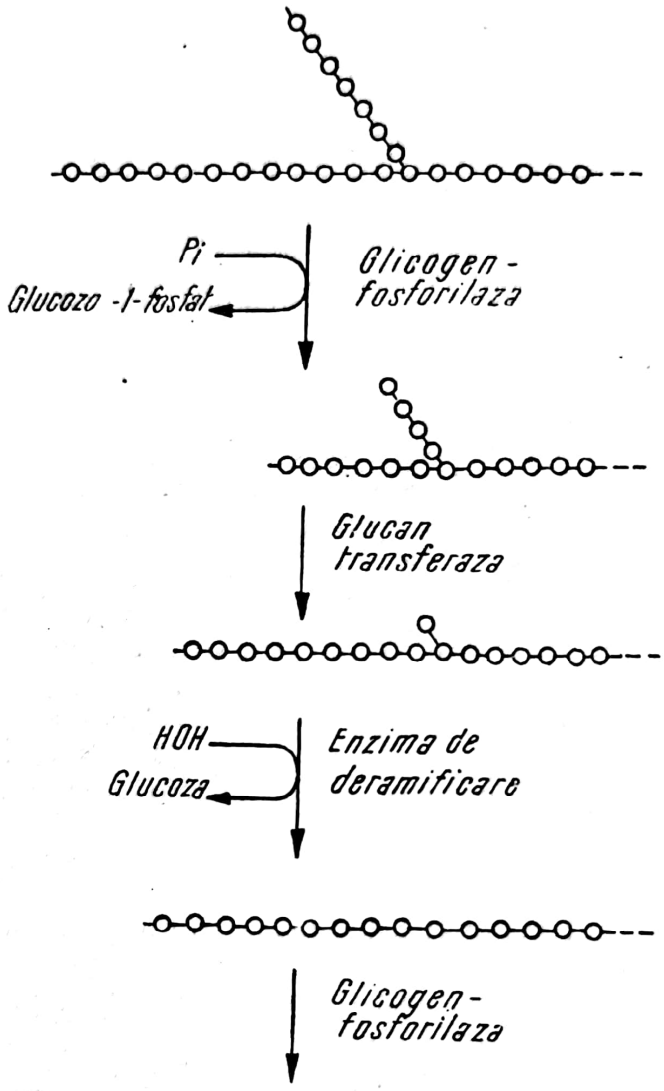
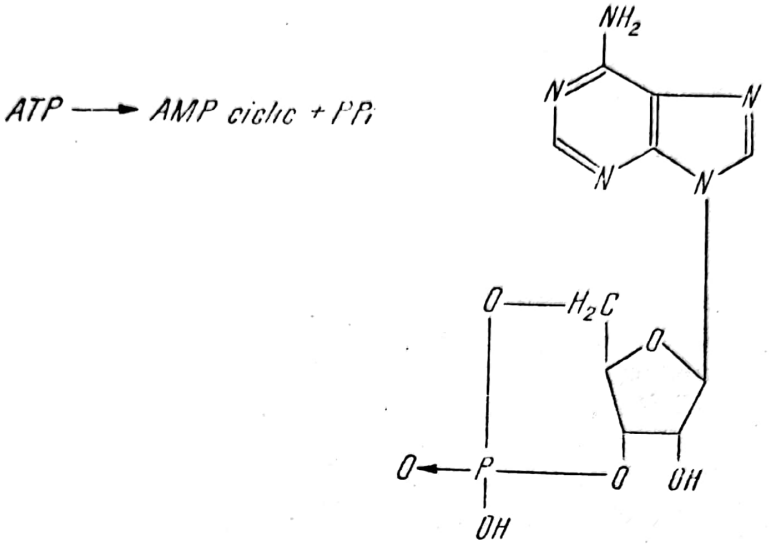


Fig. IX.6. Reprezentarea schematică a degradării tisulare a glicogenului.

la diverse specii, mai mult studiate fiind enzimele hepatice și cele din mușchi. Aceste enzime sînt alcătuite din mai multe subunități și ele se deosebesc prin structurile lor cuaternare. Totuși, controlul activității lor catalitice are loc prin mecanisme similare. Fiecare fosforilază poate exista într-o formă catalitic activă, care cuprinde resturi fosforil legate de proteină (prin legături esterice cu serina), și o formă inactivă, care este defosforilată. Este posibilă deci oscilația enzimei între forma activă și cea inactivă prin fosforilare și prin defosforilare. Fosforilarea și defosforilarea fosforilazei au loc pe căi distincte, catalizate de enzime specifice. Fosforilarea are loc prin transfer de resturi fosforil din ATP sub acțiunea unor kinaze. Defosforilarea este o reacție hidrolitică catalizată de fosfataze.

Interconversiunea fosforilazei inactive (defosfo-fosforilază) în forma activă (fosfo-fosforilază) este reglată hormonal. Acțiunea adrenalinei și a glucago-

nului, ca şi a altor hormoni, este mediată de 3',5'-adenozin-monofosfat (AMP ciclic), compus ce rezultă din ATP sub acţiunea adenil-ciclazei:



AMP ciclic

Pentru funcţia generală a AMP ciclic ca mesager chimic al acţiunii hormonilor a se vedea capitolul cu privire la hormoni.

Hormonii activează adenil ciclaza celulelor ţintă şi creşterea nivelului intracelular de AMP ciclic activează sistemul de fosfokinaze care transformă fosforilaza inactivă în forma activă (fig. IX.7).

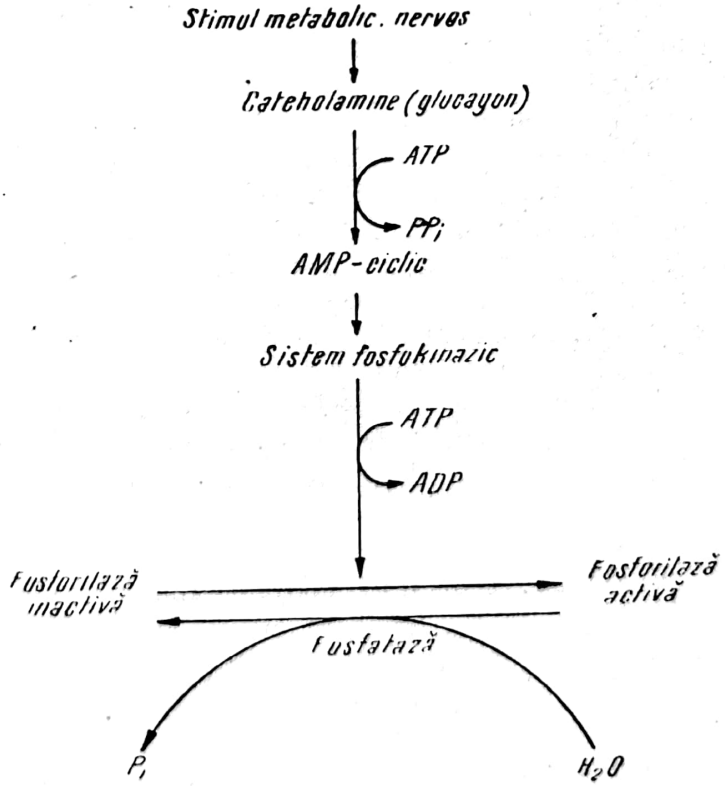


Fig. IX.7. Reglarea hormonală a glicogen fosforilazei.

Acest mecanism de activare în cascadă permite ca un semnal slab ajuns la organele receptoare să fie amplificat, pe fiecare treaptă obţinîndu-se răspunsuri metabolice considerabile.

Soarta glucozo-1-fosfatului. Glucozo-1-fosfatul este produsul principal al glicogenolizei, în raport cu frecvenţa mult mai mare a legăturilor 1→4-glicozidice faţă de cele 1→6. În condiţiile favorabile glicogenolizei, glucozo-1-fosfatul este transformat în glucozo-6-fosfat sub acţiunea unei izomeraze, glucozo-6-fosfat izomeraza:

$$\text{glucoză-1-fosfat} \rightleftharpoons \text{glucoză-6-fosfat}$$

Reacţia de la stînga la dreapta este slab exergonică ($\Delta G^{\circ\prime} = -1{,}7$ Kcal).

Glucozo-6-fosfatul suferă transformări diferite în ficat şi în muşchi. În ficat glucozo-6-fosfatul poate urma două căi principale:

a) Este hidrolizat la glucoză şi acid fosforic sub acţiunea unei enzime, cu o înaltă specificitate, glucozo-6-fosfataza:

$$\text{glucozo-6-fosfat} + \text{HOH} \rightarrow \text{glucoză} + P_i$$

Glucoza trece în circulaţie de unde este luată de toate celelalte ţesuturi şi organe. Aceasta este o modalitate de a asigura homeostazia glicemică. De fapt glucozo-6-fosfataza este prezentă doar în puţine organe (în afară de ficat se mai află în rinichi şi în intestin), dar cea mai mare activitate o prezintă enzima hepatică, ficatul fiind organul principal care trimite glucoză în sînge.

b) O a doua cale de utilizare a glucozo-6-fosfatului ce rezultă prin dislocarea glicogenului hepatic este degradarea sa oxidativă prin secvenţa Embden-Meyerhof şi ciclul acizilor tricarboxilici în vederea mobilizării de energie. Dacă se ţine seama că ficatul dispune şi de alte substrate energetice, în special de grăsimi, glucozo-6-fosfatul este utilizat într-o proporţie redusă pentru a furniza energie, cea mai mare cantitate servind la homeostazia glicemică, aceasta cu atît mai mult, cu cît factorii glicogenolitici intervin tocmai atunci cînd glicemia tinde să scadă.

În muşchi unica modalitate de utilizare a glucozo-6-fosfatului este degradarea sa la acid piruvic sau la acid lactic. Acidul piruvic va fi în continuare ars pînă la bioxid de carbon şi apă. Ţesutul muscular nu este echipat cu glucozo-6-fosfatază şi nu poate forma glucoză liberă. Muşchiul nu are capacitatea de a furniza altor ţesuturi glucoză, rezervele sale de glicogen nu sînt accesibile şi altor organe. Numai fracţiunea de acid lactic şi acid piruvic care trece în sînge şi ajunge pe această cale la alte organe, reprezintă un transport de material energetic de la muşchi la celelalte organe. Întrucît nici alte căi de utilizare a glucozei nu funcţionează în muşchi, glicoliza şi arderea la bioxid de carbon şi apă sînt singurele modalităţi de utilizare a glicogenului muscular.

4.2. GLICOGENOGENEZA

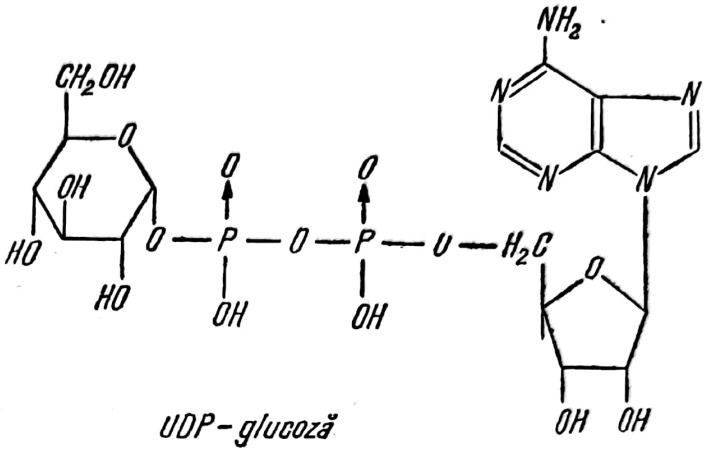
Prin glicogenogeneză se înţelege sinteza glicogenului prin reunirea resturilor glucosil în lanţuri amilozice. Glucoza care participă la acest proces poate proveni din raţia alimentară sau poate fi obţinută în ţesuturi prin sinteza sa din compuşi de altă natură, prin gluconeogeneză. Gluconeogeneza va fi tratată în subcapitolul următor. Glicogenul hepatic este obţinut din glucoză

Scanned with OKEN Scanner

de ambele proveniențe, pe cînd rezervele de glicogen muscular provin numai din glucoza sanguină, mușchiul nu este un organ gluconeogenetic.

Forma activă a glucozei în reacția de sinteză a glicogenului este derivatul său uridin-difosfat-glucoză (UDP-glucoză). Intracelular glucoza se află sub formă de glucozo-6-fosfat, așa cum rezultă din reacția catalizată de hexokinază sau prin gluconeogeneză (vezi mai departe). Urmează apoi izomerizarea glucozo-6-fosfatului în glucozo-1-fosfat (în prezența glucozo-6-fosfat izomerazei):

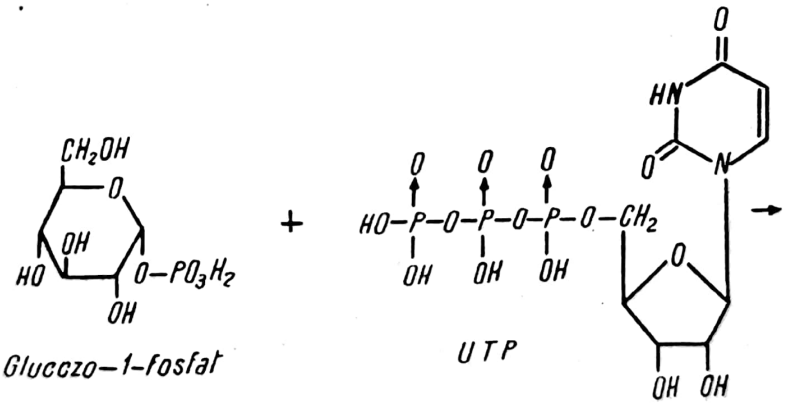
glucozo-6-fosfat ⇌ glucoză-1-fosfat



UDP-glucoză

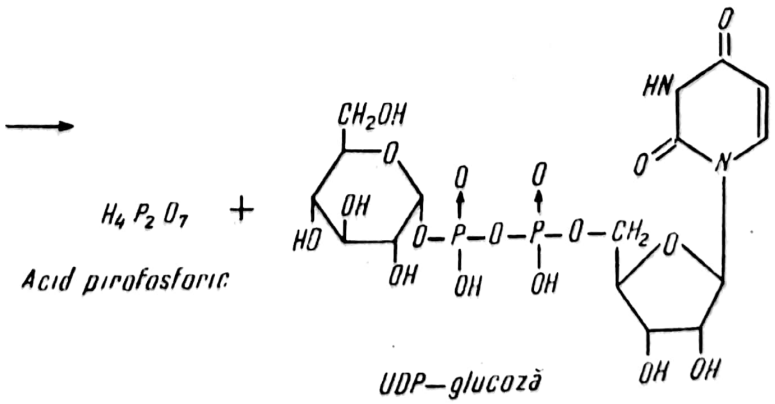
În acest sens reacția este slab endergonică ($\Delta G^{\circ\prime} = +1{,}7$ Kcal) deoarece legătura 1-fosfat, o legătură glucozidică, este mai bogată în energie ($\Delta G^{\circ\prime} = -5$ Kcal) decît legătura 6-fosfat, o legătură esterică ($\Delta G^{\circ\prime} = -3{,}3$ Kcal). Reacția va avea loc de la stînga la dreapta numai atunci cînd concentrația esterului 6-fosforic al glucozei este mare. De fapt în asemenea situație are sens biologic formarea glicogenului ca o depozitare a glucozei excedentare.

Din glucoză-1-fosfat și UTP se obține UDP-glucoza care cuprinde radicalii glucozil activi, reacția este catalizată de UDP-glucoză pirofosforilază:



Glucozo-1-fosfat

UTP



$H_4P_2O_7$

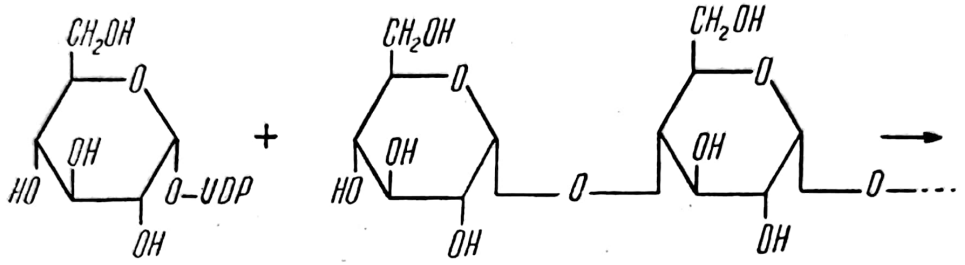
Acid pirofosforic

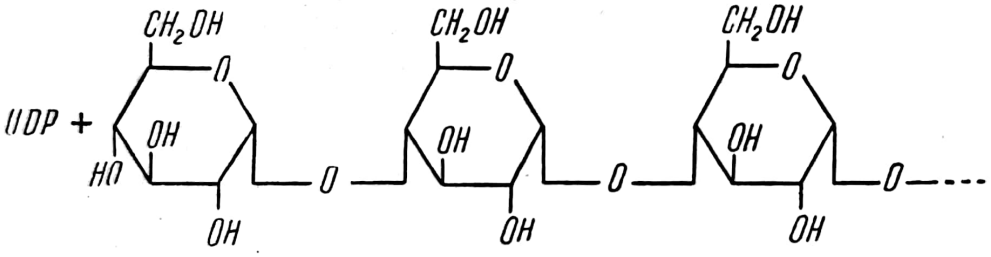
UDP-glucoză

Scanned with OKEN Scanner

Pentru obţinerea unui rest glicozil activ, din UDP-glucoză, se cheltuiesc două legături fosforice macroergice: una la fosforilarea glucozei la glucozo-6-fosfat, iar cealaltă provine din UTP. Sinteza de UDP-glucoza este costisitoare din punct de vedere energetic dar în acest fel celulele îşi asigură posibilitatea unei sinteze rapide de glicogen. De fapt, organismul îşi permite să-şi facă depozite de glicogen numai cînd dispune de rezerve energetice.

Legăturile α-(1→4)-glicozidice din glicogen sînt obţinute prin transferul resturilor glicozil din UDP-glucoză la capetele nereducătoare ale lanţurilor amilozice dintr-o moleculă incipientă de glicogen (primer). Enzima care catalizează acest transfer este glicogen sintetaza. Acţiunea sa este redată astfel:





Pentru acţiunea sintetazei este necesar ca lanţul amilozic incipient să cuprindă cel puţin patru unităţi glucozil. Prin adăugarea succesivă de resturi glucozil la primer se obţin lanţurile amilozice ale glicogenului.

Legăturile α-(1→6)-glucozidice din glicogen, legături care conferă polizaharidului o structură ramificată, se obţin prin detaşarea unor porţiuni cuprinzînd 6—7 resturi glucozil dintr-un lanţ amilozic şi ancorarea lor, prin legături α-(1→6)-glicozidice în altă regiune a lanţului. Se formează astfel două ramificaţii care sînt alungite în continuare sub acţiunea glicogen sintetazei. Enzima care catalizează transferul lanţurilor amilozice în molecula de glicogen se numeşte enzimă de ramificare. Biosinteza glicogenului sub acţiunea combinată a glicogen sintetazei şi a enzimei de ramificare este reprezentată schematic în fig. IX.8.

Reglarea hormonală a sintezei glicogenului. Sinteza glicogenului este controlată de aceeaşi hormoni, adrenalina şi glucagonul, care reglează şi glico-

Scanned with OKEN Scanner

genoliza. Printr-un mecanism complementar stimularea glicogenolizei duce la inhibarea glicogenogenezei şi viceversa. Punctul de control principal este glicogen sintetaza, enzima responsabilă de formarea legăturilor α-(1→4)-gli-

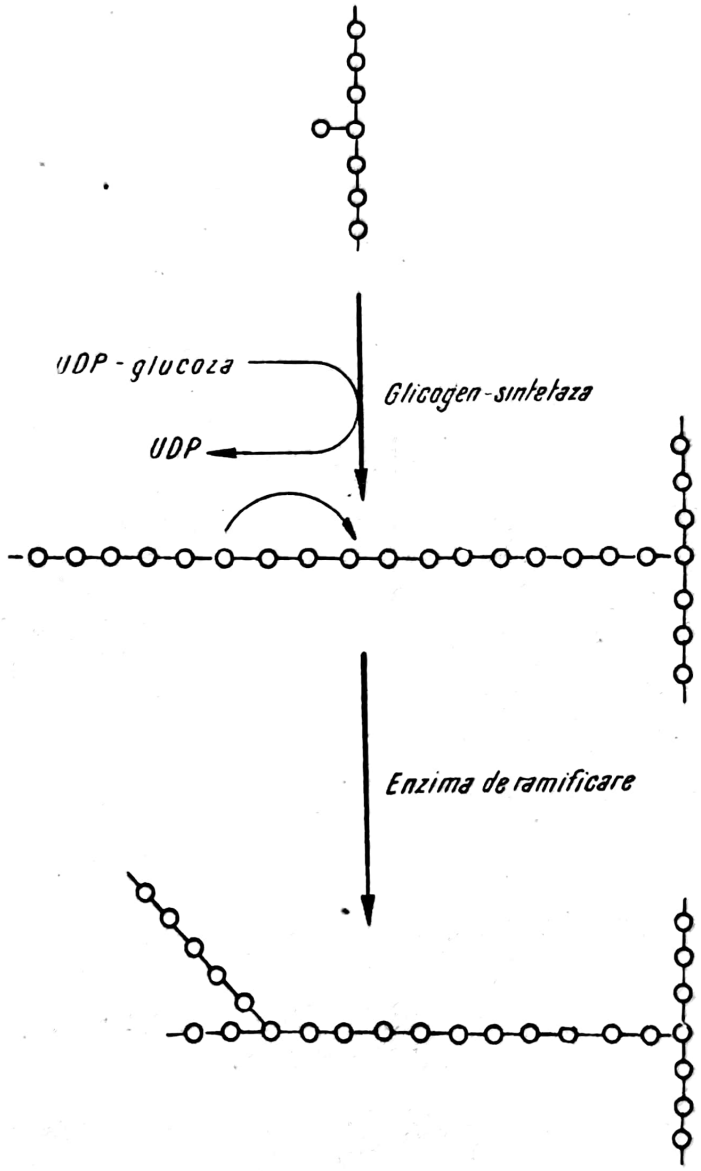


Fig. IX.8. Reprezentarea schematică a biosintezei glicogenului.

cozidice. Această enzimă există, ca şi glicogen fosforilaza, într-o formă fosforilată şi una nefosforilată, dar activitatea ei variază invers decît activitatea fosforilazei. Sintetaza fosforilată este inactivă pe cînd forma defosforilată este cea activă catalitic. Această interconversiune este reglată la nivelul unui sistem fosfokinazic a cărui activitate este stimulată de AMP-ciclic. Prin creşterea concentraţiei nucleotidului ciclic şi activarea kinazei, glicogen sintetaza este dezactivată prin fosforilare. Prin acest mecanism, acelaşi stimul

Scanned with OKEN Scanner

care declanşează eliberarea de adrenalină şi de glucagon, prin creşterea concentraţiei AMP-ciclic, determină atît inhibarea glicogen sintetazei cît şi activarea glicogen fosforilazei (fig. IX.9).

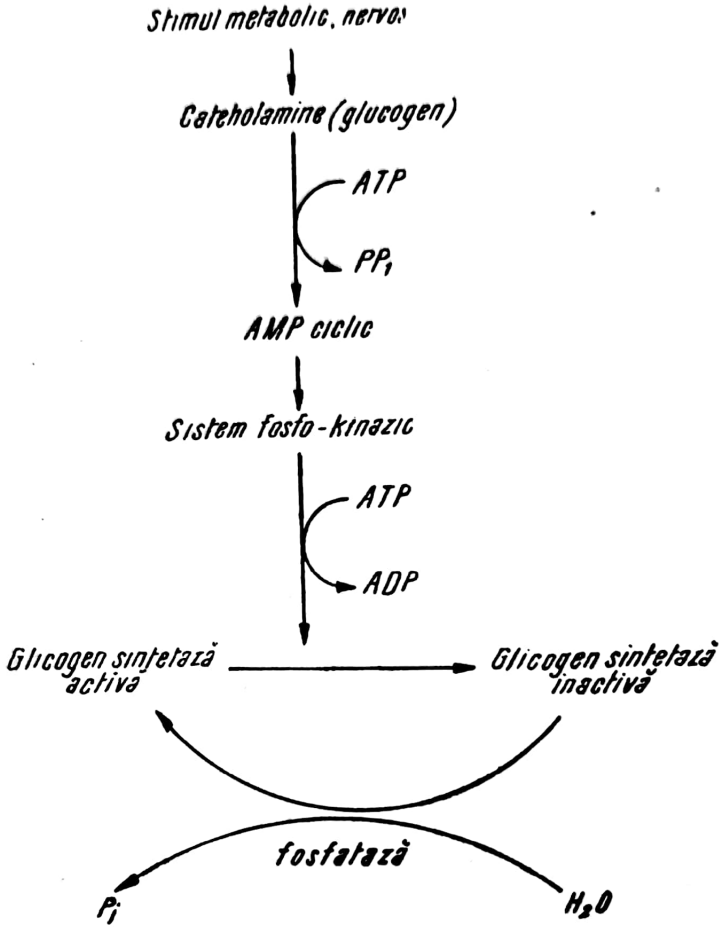


Fig. IX.9. Reglarea hormonală a glicogen sintetazei.

4.3. TULBURĂRI EREDITARE ALE METABOLISMULUI GLICOGENULUI (GLICOGENOZE)

Absenţa, determinată genetic, a unor enzime implicate în metabolismul glicogenului conduce la maladii ereditare foarte grave, denumite glicogenoze. La bolnavii cu erori genetice de sinteză sau de utilizare a glicogenului se acumulează în ţesuturi glicogen cu structură normală sau anormală. Aceste boli se manifestă din primele zile sau săptămîni de viaţă şi în cele mai multe cazuri subiecţii sucombă înainte de vîrsta adultă. Cercetarea defectelor enzimatice prezentate de bolnavii cu glicogenoze a permis elucidarea multor aspecte obscure ale metabolismului glicogenului.

Glicogenozele ale căror defecte metabolice sînt cel mai bine caracterizate sînt următoarele:

1. *Boala von Gierke* (*glicogenoza hepato-renală, glicogenoza de tip I*). Este determinată de acumularea în ficat şi în rinichi a unor cantităţi excesive de glicogen cu structură normală. Eroarea genetică la aceşti bolnavi constă în sinteza defectuoasă a glucozo-6-fosfatazei hepatice şi renale. Absenţa acestei

enzime blochează utilizarea glicogenului hepatic pentru export de glucoză. Tulburarea clinică majoră la acești bolnavi este hipoglicemia.

2. *Glicogenoza generalizată (glicogenoza de tip II).* Este caracterizată prin depunere de glicogen cu structură normală în toate țesuturile, inclusiv inimă, mușchi, creier. Defectul metabolic constă în absența enzimei lisosomale, α-(1→4)-glucozidaza, care detașează hidrolitic glucoza din lanțurile amilozice externe ale glicogenului. Bolnavii prezintă tulburări cardiace, nervoase, musculare, cu predominanța unora sau altora după intensitatea defectului enzimatic în aceste țesuturi.

3. *Dextrinoza limită (glicogenoza de tipul III).* Se caracterizează prin depunerea în ficat și (sau) în mușchii scheletici și inimă, de glicogen cu un grad mai mare de ramificație decît glicogenul normal. Defectul metabolic al acestei glicogenoze este constituit din absența sau activitatea scăzută a enzimei de deramificare. În absența acestei enzime la degradarea glicogenului nu pot fi depășite legăturile (1→6)-glicozidice. Glicogenul sintetizat de acești bolnavi, pornind de la un primer cu un număr mare de capete amilozice nereducătoare, prezintă un raport între numărul de legături α-(1→4)-glicozidice și numărul de legături α-(1→6)-glicozidice mai mic decît glicogenul normal.

4. *Amilopectinoza (boala Andersen, glicogenoză de tip IV).* La bolnavii cu această glicogenoză se acumulează în ficat și în alte organe (splină, ganglioni limfatici) glicogen cu un grad de ramificație mai redus decît al glicogenului normal. Legăturile α-(1→6)-glicozidice sînt puțin numeroase, acest glicogen asemănîndu-se cu polizaharidul ramificat din amidon, amilopectina. În acest caz defectul metabolic se află la nivelul enzimei de ramificare.

5. *Boala McArdle (glicogenoza de tip V).* Această boală este determinată de sinteza defectuoasă a glicogen fosforilazei musculare. Bolnavii prezentînd acest defect cuprind cantități mai mari de glicogen muscular pe care însă nu îl pot utiliza din cauza activității reduse a fosforilazei. Acești bolnavi sînt incapabili de eforturi fizice, chiar moderate.

6. *Boala Hers (glicogenoza hepatică, glicogenoza de tip VI).* Este caracterizată prin acumulare de glicogen cu structură normală în ficat dar care este indisponibil datorită activității scăzute a fosforilazei. Activitatea redusă a glicogen fosforilazei poate fi cauzată fie de sinteza unei enzime defecte fie de ineficiența sistemului de activare a fosforilazei.

5. GLUCONEOGENEZA

Prin gluconeogeneză se înțelege procesul de biosinteză a glucozei din precursori de natură neglucidică. Este vorba prin urmare de sinteza de novo a moleculei de hexoză și nu de o conversie a unei alte hexoze în glucoză. Gluconeogeneza reprezintă pentru organism unica modalitate de a obține glucoză atunci cînd aportul exogen de glucide este întrerupt și cînd rezervele tisulare de glicogen au fost epuizate. Gluconeogeneza este activă în perioadele de foame, mai lungi sau mai scurte, sau atunci cînd organismul este supus la exerciții fizice intense și de durată mai lungă.

Organismul omului, pentru anumite activități, consumă exclusiv glucoză și în condiții extreme aceste nevoi sînt asigurate prin gluconeogeneză. Nevoile ireductibile ale organismului pentru glucoză sînt următoarele:

a) Creierul și sistemul nervos periferic utilizează ca substrat energetic aproape în exclusivitate glucoza.

Scanned with OKEN Scanner

b) Hematiile, fiind lipsite de mitocondrii, obţin energie numai prin scindarea glucozei la acid lactic (glicoliză).

c) În toate ţesuturile funcţionarea eficientă a ciclului acizilor tricarboxilici implică existenţa unor concentraţii potrivite de oxaloacetat care se formează din glucoză (via piruvat prin carboxilare).

d) Glicerolul necesar sintezei de trigliceride este obţinut în ţesuturile extrahepatice din glucoză.

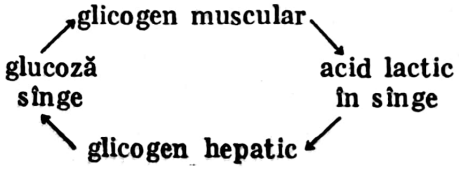
e) Pentozele, toate celelalte hexoze şi derivaţii lor (acizi uronici, hexozamine) sînt obţinute din glucoză.

f) Prin calea fosfogluconatului, glucoza furnizează NADPH.

Toate aceste fapte fac necesară existenţa unui mecanism pentru a obţine glucoză din compuşi de altă natură, pentru a acoperi cel puţin nevoile limită ale organismului în acest compus. Acest mecanism este gluconeogeneza. Sediul gluconeogenezei este ficatul. Un al doilea organ dotat cu echipamentul enzimatic gluconeogenetic este rinichiul, dar rolul lui este mai puţin important, în orice caz asigură numai nevoile proprii în glucoză, nu şi ale celorlalte organe.

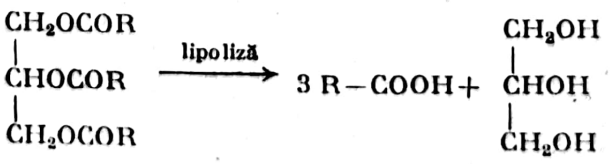
Substratele gluconeogenetice sînt: acidul lactic (sau acidul piruvic), glicerolul şi fragmente din catenele hidrocarbonate şi ternare ale aminoacizilor (aminoacizi glucogenici).

Acidul lactic este unul din substratele principale ale gluconeogenezei. Acest compus se formează în organism prin glicoliză. Este deci un compus de origine glucidică. Totuşi, conversiunea acidului lactic în glucoză are loc totdeauna în alt ţesut (în ficat) decît acelea în care s-a format, astfel încît pentru organul gluconeogenetic acidul lactic este un substrat neglucidic. Organele producătoare de acid lactic gluconeogenetic sînt muşchii scheletici în activitate şi hematiile. Dacă ţinem seama de proveniența acidului lactic în muşchi — dislocarea glicogenului — şi de posibilitatea ca în ficat acidul lactic să fie convertit în glucoză şi mai tîrziu aceasta să fie redată circulaţiei, se poate defini un ciclu al acidului lactic (ciclul Cori):



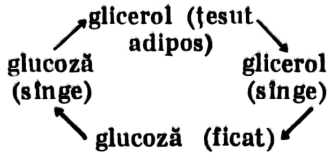
Producţia de acid lactic în muşchi după epuizarea rezervelor de glicogen, cînd gluconeogeneza este foarte intensă, este redusă pentru că în aceste condiţii metabolismul energetic al muşchilor este comutat spre arderea acizilor graşi. În schimb formarea acidului lactic în hematii are loc într-un ritm constant, şi în situaţiile limită, acidul lactic gluconeogenetic are numai această origine.

Un al doilea substrat gluconeogenetic este glicerolul care rezultă prin hidroliza (lipoliza) trigliceridelor tisulare:



Scanned with OKEN Scanner

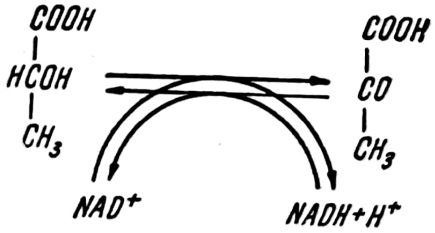
Într-o oarecare măsură glicerolul este de proveniență exogenă, a fost introdus în organism odată cu rația alimentară sub formă de grăsimi. Însă trigliceridele din diverse țesuturi, din țesutul adipos în cea mai mare parte, cuprind glicerol care a fost obținut, in situ, din glucoză. În perioadele de gluconeogeneză activă aceste trigliceride sînt hidrolizate, glicerolul este trecut în sînge, este captat de ficat și apoi convertit în glucoză. Deci și în acest caz, ca și în acela al acidului lactic, are loc o circulație a atomilor de carbon ai glucozei (ciclul glicerolului):



O a treia sursă de precursori gluconeogenetici sînt aminoacizii care rezultă prin dislocarea proteinelor din mușchi și din ficat. Avînd în vedere mărimea depozitelor de proteine înțelegem că aminoacizii reprezintă substratele gluconeogenetice cele mai abundente.

5.1. CALEA GLUCONEOGENETICĂ

Această secvență de reacții începe cu acidul piruvic, care parcurgînd în sens invers secvența Embden-Meyerhof dă naștere la glucoză. Acidul lactic pătrunde în calea gluconeogenetică prin oxidarea sa la acid piruvic:



Reacția este catalizată de lactat dehidrogeneză. Pătrunderea celorlalți precursori în secvența de reacții gluconeogenetice va fi arătată mai tîrziu.

Calea gluconeogenetică este în principiu o inversare a secvenței Embden-Meyerhof. Însă datorită unor bariere energetice unele reacții ale secvenței nu sînt ușor reversibile și ele nu pot avea loc în ambele sensuri prin același mecanism. Trei reacții ale secvenței Embden-Meyerhof în condițiile fiziologice sînt practic ireversibile și au loc pe căi diferite în glicoliză și în gluconeogeneză (fig. IX.10). Acestea sînt:

(1) transformarea: glucoză → glucozo-6-fosfat;

(2) transformarea: fructozo-6-fosfat → fructozo-1,6-difosfat;

(3) transformarea: piruvat → fosfoenolpiruvat.

Dacă urmărim secvența Embden-Meyerhof în sens gluconeogenetic. prima barieră energetică este transformarea piruvatului în fosfoenol-piruvat, Fosforilarea piruvatului pe seama ATP-ului nu este favorabilă din punct de

Scanned with OKEN Scanner

vedere energetic pentru că legătura fosfat macroergică din fosfoenolpiruvat este foarte bogată în energie ($\Delta G^{\circ\prime} = -14{,}8$ Kcal).

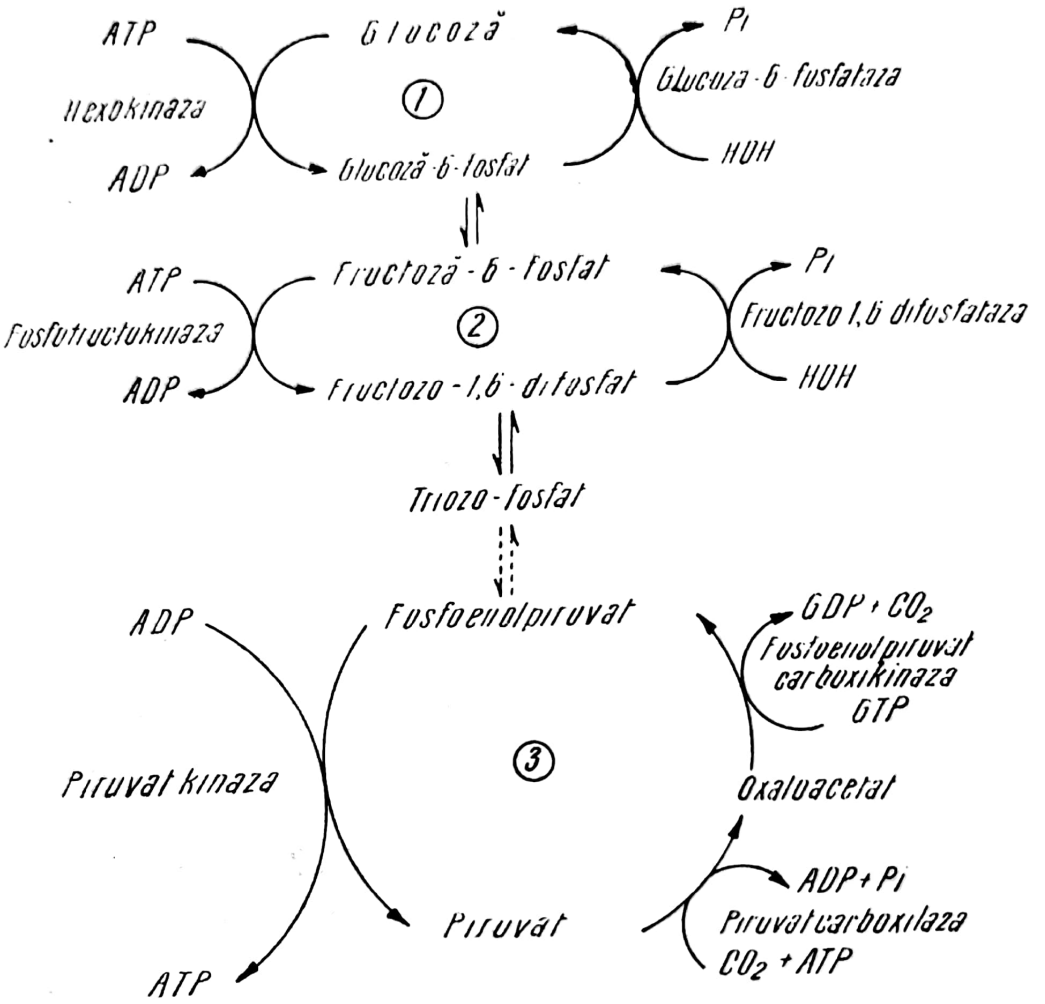
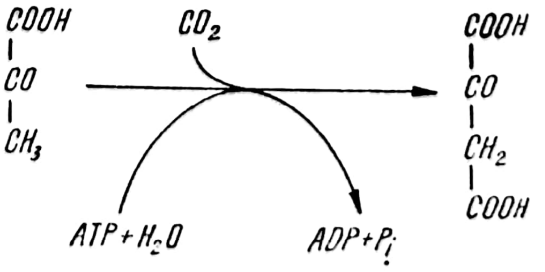


Fig. IX.10. **Etapele distincte ale secvenţei Embden-Meyerhof de degradare a glucozei şi ale căii gluconeogenetice.**

În secvenţa gluconeogenetică transformarea piruvatului în fosfoenolpiruvat are loc prin două reacţii şi cu un consum net de două legături fosfat macroergice. Aceste reacţii sînt:

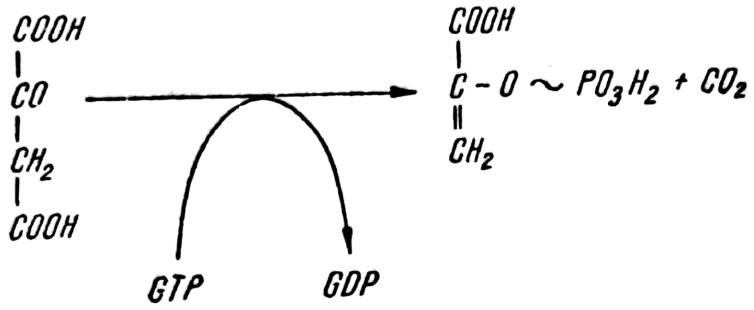
a) Carboxilarea piruvatului la oxaloacetat, în prezenţa piruvat carboxilazei, reacţie biotin-dependentă:



Rolul acestei etape în reglarea gluconeogenezei va fi discutat mai departe şi este legat de dependenţa absolută a enzimei de acetil-CoA.

Scanned with OKEN Scanner

b) Oxaloacetatul suferă apoi o decarboxilare cuplată cu o fosforilare (decarboxilare fosforilantă) în care se consumă o legătură macroergică din guanozin-trifosfat (GTP):



oxaloacetat *fosfoenolpiruvat*

Enzima care catalizează această reacţie este fosfoenolpiruvat carboxikinaza. Legătura macroergică din GTP provine din ATP, printr-o reacţie de transfosforilare:

$$GDP + ATP \rightarrow GTP + ADP$$

Prin însumarea acestor reacţii parţiale obţinem ecuaţia:

$$\text{piruvat} + 2\,ATP + H_2O \rightarrow \text{fosfoenolpiruvat} + 2\,ADP + P_i$$

care arată că pentru fosforilarea piruvatului pe această cale se cheltuiesc două legături fosfat macroergice, ceea ce face ca reacţia de la stînga la dreapta să devină exergonică şi să se poată desfăşura uşor.

Fosfoenolpiruvatul este transformat în triozofosfaţi (gliceraldehidă-3-fosfat şi dihidroxiacetonă-fosfat) care printr-o condensare aldolică (catalizată de aldolază) dau naştere la fructozo-1,6-difosfat. Următoarea reacţie prin care fructozo-1,6-difosfatul se transformă în fructozo-6-fosfat are loc în gluconeogeneză prin alt mecanism decît în glicoliză şi este catalizată de o altă enzimă. Este o reacţie de hidroliză catalizată de fructozo-1,6-difosfataza:

$$\text{fructoza-1,6-difosfat} + HOH \rightarrow \text{fructoză-6-P} + P_i$$

După izomerizarea fructozo-6-fosfatului în glucozo-6-fosfat (reacţie uşor reversibilă) urmează eliberarea glucozei prin hidroliza esterului:

$$\text{glucoză-6-fosfat} + HOH \rightarrow \text{glucoză} + P_i$$

Reacţia este catalizată de glucozo-6-fosfataza, enzimă cu o specificitate cvasi absolută pentru acest compus. Aceasta este cea de a treia reacţie specifică secvenţei gluconeogenetice.

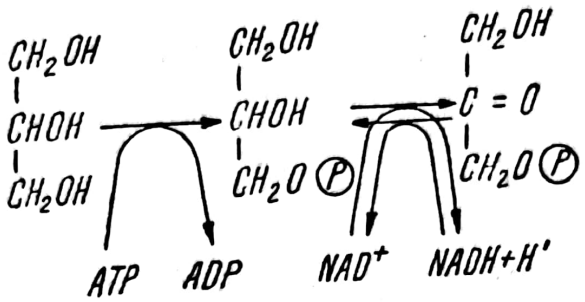
Ecuaţia globală a sintezei unei molecule de glucoză din acid piruvic este:

$$2CH_3-CO-COOH + 6ATP + 2NADH + 2H^+ + 6H_2O \rightarrow C_6H_{12}O_6 + 2NAD^+ + 6ADP + 6P_i$$

Această ecuaţie arată că procesul consumă şase legături macroergice din ATP în opoziţie cu secvenţa de degradare (glucoză → 2 acid piruvic) care are

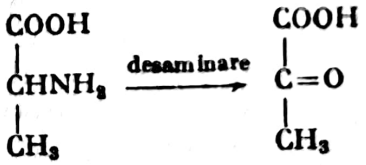
loc cu sinteză cuplată de ATP. Totodată mai trebuie subliniat că gluconeogeneza este un proces reductiv şi va necesita o sursă de NADH.

Gluconeogeneza din glicerol. Glicerolul pătrunde în calea gluconeogenetică prin transformarea sa într-un triozofosfat, respectiv în dihidroxiacetonă-fosfat. Într-o primă etapă glicerolul este fosforilat sub acţiunea unei kinaze specifice (glicerol kinaza) la glicerol fosfat, care prin dehidrogenare (în prezenţa glicerol-fosfat dehidrogenazei) dă naştere la dihidroxiacetonă-fosfat:



Dihidroxiacetono-fosfatul se izomerizează reversibil în gliceraldehidă-3-fosfat şi împreună cu cei doi triozo-fosfaţi prin condensare aldolică formează fructozo-1,6-difosfat.

Gluconeogeneza din aminoacizi. Dintre cei 20 aminoacizi care intră în constituţia proteinelor tisulare numai unul singur, leucina, nu este convertibil în glucoză. Toţi ceilalţi sînt aminoacizi gluco-formatori, catena lor de atomi de carbon, în totalitate sau numai fragmentar, poate fi utilizată pentru sinteză de glucoză. În principiu aminoacizii pătrund în calea gluconeogenetică după îndepărtarea grupărilor aminice şi transformarea lor în compuşi ternari, fără azot. De exemplu, compusul ternar corespunzător alaninei este acidul piruvic:



Căile specifice prin care fiecare aminoacid glucoformator dă naştere la un precursor gluconeogenetic vor fi descrise în capitolul privind metabolismul aminoacizilor. În afară de alanină alţi patru aminoacizi (cisteina, glicina, serina şi treonina) dau naştere la acid piruvic. Ceilalţi aminoacizi glucoformatori conduc la intermediari ai ciclului acizilor tricarboxilici, ca acid α-cetoglutaric, acid succinic, acid fumaric sau acid oxaloacetic. Aceşti compuşi prin parcurgerea reacţiilor ciclului vor da naştere la acid oxaloacetic. Acidul oxaloacetic, aşa cum s-a arătat mai înainte, prin decarboxilare fosforilantă se transformă în fosfoenolpiruvat.

5.2. REGLAREA GLUCONEOGENEZEI

Rezervele de glucide ale organismului uman sînt foarte reduse în comparaţie cu depozitele de grăsimi şi de proteine. În perioadele mai lungi sau mai scurte dintre mese ca şi în cursul unor activităţi fizice mai intense homeostazia glicemică este menţinută în exclusivitate prin gluconeogeneză. Pentru o intervenţie rapidă şi eficientă a gluconeogenezei, organismul dispune

Scanned with OKEN Scanner

de mecanisme de control complexe şi foarte prompte. Ecuaţia globală a gluconeogenezei din piruvat:

$$2\ \text{piruvat} + 6\text{ATP} + 2\text{NADH} + 2\text{H}^+ + 6\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{glucoză} + 6\text{ADP} + 6\text{P}_i + 2\text{NAD}^+$$

arată că pentru sinteză de glucoză sînt necesare, o sursă de atomi de carbon, echivalenţi reducători sub formă de NADH şi o sursă de energie care să furnizeze ATP. Aprovizionarea gluconeogenezei cu NADH şi cu ATP este asigurată de degradarea oxidativă a acizilor graşi. Perioadele în care gluconeogeneza este activă sînt tocmai acelea cînd organismul mobilizează triglicéridele de rezervă din ţesutul adipos şi eliberează acizi graşi în circulaţie de unde sînt preluaţi de către ţesuturi. Prin degradarea oxidativă a acizilor graşi (β-oxidare) rezultă acetil-CoA care prin degradare în ciclul acizilor tricarboxilici şi lanţul respirator furnizează ATP în cantităţile impuse de nevoile energetice imediate. Pe de altă parte acetil-CoA este un efector alosteric pozitiv al piruvat carboxilazei şi devine un metabolit reglator al gluconeogenezei.

Un alt aspect al reglării gluconeogenezei este următorul: ficatul — organul glucoformator — pentru a deveni un producător net de glucoză trebuie să nu poată utiliza glucoza în reacţii de degradare, deci secvenţa Embden-Meyerhof în sens glicolitic trebuie să fie inhibată. Gluconeogeneza este reglată la nivelul reacţiilor ireversibile, tocmai acelea care diferenţiază secvenţa biosintetică de cea degradativă. Dintre acestea cel mai fin este controlată reacţia de carboxilare a piruvatului la oxaloacetat. Piruvat carboxilaza este activată alosteric de acetil-CoA, produsă prin β-oxidarea acizilor graşi. În schimb, reacţia de utilizare oxidativă a acidului piruvic — decarboxilarea sa oxidativă la acetil-CoA — este inhibată tot de acetil-CoA. Prin urmare degradarea oxidativă a acizilor graşi împiedică utilizarea oxidativă a piruvatului şi îl dirijează spre gluconeogeneză.

Reglarea hormonală a gluconeogenezei. Alături de acest control metabolic la reglarea gluconeogenezei participă diverşi hormoni. Principalele intervenţii hormonale în gluconeogeneză sînt:

Insulina acţionează direct la nivelul ficatului inhibînd gluconeogeneza prin represia sintezei enzimelor cheie gluconeogenetice: piruvat carboxilaza, fructozo-1,6-difosfataza, glucozo-6-fosfataza. În insuficienţa insulinică pe lîngă utilizarea tisulară defectuoasă a glucozei se mai adaugă şi insuficienţa acestui control al gluconeogenezei ceea ce accentuează şi mai mult hiperglicemia.

Glucocorticoizii (cortisolul) au acţiune gluconeogenetică pronunţată. Mecanismul principal de accelerare a gluconeogenezei constă în stimularea dislocării proteinelor musculare şi hepatice care furnizează aminoacizi ca substrate gluconeogenetice. Alături de acest mod de acţiune glucocorticoizii mai intervin şi prin inducţia sintezei enzimelor gluconeogenetice din ficat (efect opus cu acela represor al insulinei).

Hormonii care stimulează degradarea trigliceridelor din ţesutul adipos (hormonii lipolitici) sînt factori care favorizează şi ei gluconeogeneza. Ei intervin prin aprovizionarea organismului cu substrate energetice, acizi graşi

Scanned with OKEN Scanner

și glicerol ca substrat gluconeogenetic. Acizii grași prin β-oxidare dau naștere la acetil-CoA, metabolit care dirijează piruvatul spre gluconeogeneză prin activarea piruvat carboxilazei și inhibiția piruvat dehidrogenazei.

6. REGLAREA GLICEMIEI

Homeostazia glicemică, menținerea nivelului sanguin al glucozei între anumite limite este un mecanism de control complex la care participă diverși factori metabolici și hormonali. Glicemia à jeun (dimineața înainte de masă),

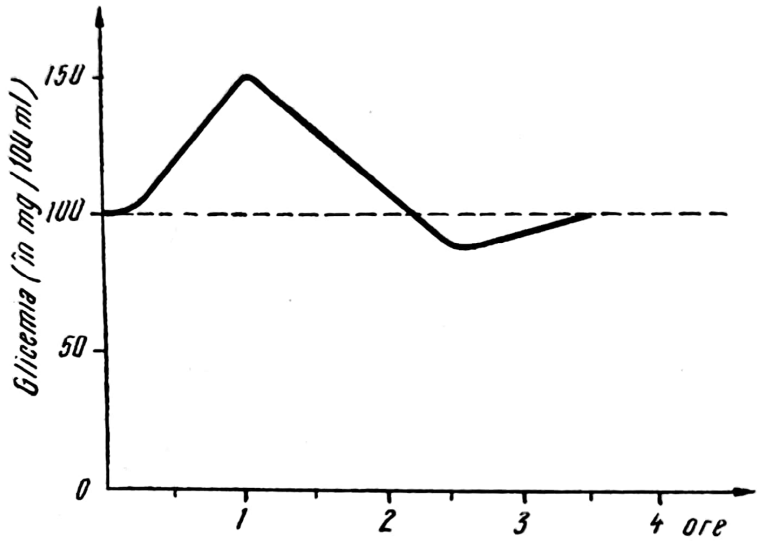


Fig. IX.11. Variația glicemiei după administrare orală de glucoză (1 g/kg greutate corporală).

la un adult normal este de 80—100 mg la 100 ml sînge. La nou-născut glicemia este mică în primele ore de viață dar crește în următoarele cîteva zile. După ingestia de alimente care cuprind glucide are loc o creștere tranzitorie a glicemiei. În mod normal această hiperglicemie post-prandială nu trebuie să fie mai mare de 120—130 mg/100 ml și să nu dureze mai mult de două ore. Prin administrarea unor cantități date de glucoză (oral sau intravenos) și urmărirea evoluției glicemiei se poate evolua capacitatea organismului de a răspunde la încărcare glucidică (proba hiperglicemiei provocate). La subiecții normali după administrarea orală de glucoză (1 g/kilocorp) glicemia crește imediat atingînd valoarea maximă (150 mg/100 ml) după aproximativ 45 minute. Urmează apoi scăderea glicemiei și după o hipoglicemie ușoară, la aproximativ trei ore se atinge valoarea de timp zero (fig. IX.11). În foame prelungită și în inaniție glicemia scade, dar nivelul cel mai mic al glicemiei compatibil cu supraviețuirea este de aproximativ 50 mg/100 ml. Hiperglicemia în sine nu are nici o acțiune dăunătoare asupra organismului și pînă la instalarea efectelor secundare organismul poate suporta hiperglicemii oricît de mari. Hipoglicemiile, întrucît nu asigură sistemul nervos cu substrat energetic — glucoza — sînt foarte greu tolerate de către organism. Tocmai de aceea mecanismele de apărare a organismului împotriva hipoglice-

Scanned with OKEN Scanner

miilor sînt mult mai complexe şi mai eficace decît acelea care îl protejează împotriva hiperglicemiilor.

Factorii de control ai homeostaziei glicemice acţionează prin modificarea vitezei de intrare a glucozei în sînge sau de ieşire a sa.

6.1. CĂILE DE INTRARE A GLUCOZEI ÎN SÎNGE

a) *Raţia alimentară* este una din sursele principale de glucoză sanguină. Amidonul din alimente prin hidroliză digestivă dă naştere la glucoză, zaharoza la glucoză şi fructoză şi lactoza la galactoză şi glucoză. O parte din glucoza prezentă în sîngele port este reţinută în ficat iar restul este trecută în circulaţia sistemică contribuind la creşterea imediată a glicemiei. Galactoza şi fructoza care nu au fost convertite în glucoză în celulele mucoasei intestinale sînt reţinute integral în ficat unde sînt transformate în glucoză şi pot contribui mai tîrziu la creşterea glicemiei. Deci, ficatul în perioadele de alimentare şi acelea imediat următoare este un organ care reţine glucoza în contrast cu rolul său de furnizor de glucoză în perioadele dintre mese.

b) *Rezervele de glicogen hepatic* constituie o a doua sursă de glucoză sanguină. Mobilizarea acestui depozit de glucide are loc prin secvenţa de reacţii:

$$\text{glicogen} \xrightarrow[\text{fosforilază}]{} \text{glucoză-1-P} \xrightarrow[\text{fosfo-gluco-mutază}]{} \text{glucoză-6-P} \xrightarrow[\text{glucozo-6-fosfatază}]{} \text{glucoză}$$

Numai depozitul de glicogen hepatic este o sursă imediată de glucoză sanguină deoarece numai în ficat există glucozo-6-fosfatază care eliberează glucoza din esterul său fosforic. Muşchiul posedă rezerve de glicogen dar el nu poate alimenta sîngele cu glucoză deoarece este lipsit de glucozo-6-fosfatază. Prin intermediul ciclului acidului lactic o parte din unităţile glucozil ale glicogenului muscular pot ajunge sub formă de glucoză circulantă. Această cale implică funcţionarea mecanismelor gluconeogenetice.

c) *Gluconeogeneza* reprezintă a treia cale de aprovizionare a compartimentului extracelular cu glucoză. Ficatul deţine şi în acest caz rolul principal. Un alt organ gluconeogenetic este rinichiul dar contribuţia lui este redusă. Substratele gluconeogenetice sînt acidul lactic, aminoacizii şi glicerolul.

6.2. CĂILE DE IEŞIRE A GLUCOZEI DIN SÎNGE

a) În mod normal singura modalitate de ieşire a glucozei din sînge este pătrunderea în celule şi utilizarea ei catabolică sau anabolică. Celulele nu cuprind glucoză liberă, deoarece intracelular glucoza este fosforilată în glucozo-6-fosfat (sub acţiunea hexokinazei sau a glucokinazei) şi în această formă este dirijată fie spre o cale anabolică (depozitare sub formă de glicogen, conversie în grăsimi, în aminoacizi), fie este degradată (glicoliză, oxidare la bioxid de carbon şi apă).

Cantităţile de glucoză extrase din sînge de către diverse ţesuturi depind de natura ţesutului, de intensitatea metabolismului cît şi de o serie de factori hormonali. În ceea ce priveşte modul de pătrundere a glucozei în celule se deosebesc celule cu membrane permeabile pentru glucoză şi altele în care pătrunderea glucozei este un proces mediat de un sistem transportor activat

Scanned with OKEN Scanner

de insulină. Se deosebesc prin urmare țesuturi insulino-dependente și insulino-independente (în care glucoza pătrunde liber).

Țesuturile insulino-dependente sînt: mușchii scheletici, mușchiul cardiac, țesutul adipos, osul, cartilajele, leucocitele.

Țesuturile insulino-independente sînt: ficatul, hematiile, rinichiul, creierul, insulele Langerhans din pancreas, mucoasa intenstinală. Musculatura scheletică și țesutul adipos, țesuturi insulino-sensibile, reprezintă o fracțiune importantă din țesuturile metabolic active ale organismului și explică rolul pe care îl joacă insulina în utilizarea corectă a glucozei. Ficatul — țesut insulino-independent — ocupă o poziție particulară în raport cu celelalte țesuturi liber permeabile pentru glucoză. Ficatul nu extrage glucoză din sînge decît în perioadele hiperglicemice, în alte condiții fiind un furnizor de glucoză sanguină.

Capacitatea ficatului de a capta glucoză din sînge în perioadele hiperglicemice este asigurată de fosforilarea ei mai rapidă sub acțiunea glucokinazei. Avînd o constantă Michaelis mare (0,01 M), enzima funcționează submaximal și creșterea glicemiei se reflectă într-o accelerare a formării glucozo-6-P. Pe de altă parte, insulina este un inductor al sintezei glucokinazei, mărind cantitatea de proteină catalitică.

b) O a doua cale de ieșire a glucozei din sînge este eliminarea sa pe cale renală (glucozurie sau glicozurie). Este o cale operantă doar la concentrații mai mari ale glucozei sanguine, care depășesc pragul de eliminare renală a glucozei și reprezintă o supapă de siguranță prin care organismul este protejat împotriva hiperglicemiilor.

Homeostazia glicemică este rezultatul unei echilibrări foarte fine a cantităților de glucoză care sînt scoase din sînge cu acelea introduse prin aport alimentar, prin glicogenoliză și prin gluconeogeneză. Reglarea fundamentală a glicemiei se face prin intermediul hormonilor pancreatici, insulina și glucagonul. Ca factori auxiliari mai intervin catecolaminele (adrenalina) și glucocorticoizii (cortisolul).

Insulina este hormonul pancreatic secretat de celulele β ale insulelor Langerhans. Membrana plasmatică a acestor celule este permeabilă pentru glucoză încît concentrația intracelulară a glucozei este egală cu nivelul glicemiei. O ușoară hiperglicemie constituie stimulul pentru sinteza și eliberarea de insulină. Descărcarea insulinică accelerează tranzitul de glucoză din compartimentul extracelular în țesuturile insulino-dependente. În aceste țesuturi glucoza va fi în parte consumată ca substrat energetic, iar excesul va fi depozitat sub formă de glicogen (în mușchi) sau după conversie în acizi grași și în glicerol sub formă de grăsimi (în țesutul adipos).

Glucagonul, hormonul pancreatic secretat de celulele de tip α din insulele Langerhans, are acțiune antagonică cu a insulinei. Secreția de glucagon este declanșată de hipoglicemie. Glucagonul intervine în mecanismul homeostaziei glicemice prin stimularea glicogen-fosforilazei din ficat, astfel că întreaga secvență de reacții:

$$\text{glicogen hepatic} \rightarrow \text{glucoză-1-fosfat} \rightarrow \text{glucoză-6-fosfat} \rightarrow \text{glucoză} + P_i$$

este accelerată și crește efluxul hepatic de glucoză.

Scanned with OKEN Scanner

Adrenalina, hormonul secretat de medulo-suprarenală, joacă un rol important în asigurarea unor niveluri adecvate ale glicemiei în situaţii în care organismul trebuie să se adapteze rapid unor consumuri de substrate energetice în general şi de glucoză în special. Expunerile la frig, emoţiile, în general factorii stresarţi declanşează eliberare de adernalină prin stimulare nervoasă simpatică a glandelor medulo-suprarenale. Adrenalina acţionează ca factor hiperglicemiant în mai multe moduri.

— Adrenalina accelerează glicogenoliza hepatică şi musculară prin activarea glicogen-fosforilazei. Din glicogenul hepatic rezultă imediat glucoză sanguină utilizabilă ca substrat energetic, mai ales de către creier. Din glicogenul muscular prin accelerarea secvenţei de reacţii:

glicogen muscular → glucoză-1-fosfat → glucoză-6-fosfat → acid lactic

se obţine acid lactic care poate trece în circulaţie. În parte acidul lactic este utilizat ca substrat energetic după conversie în acid piruvic (în miocard), iar cealaltă parte este utilizată ca substrat gluconeogenetic în ficat, fiind apoi redat circulaţiei sub formă de glucoză.

— Adrenalina mai intervine în modul de utilizare a glucozei sanguine şi indirect prin acţiunea sa lipolitică. Adrenalina stimulează hidroliza grăsimilor din ţesutul adipos (lipoliză) ceea ce are ca rezultat eliberarea în sînge a acizilor graşi, substrate energetice preferate ale unor ţesuturi (muşchi, miocard, rinichi) şi a glicerolului, substrat gluconeogenetic. Totodată adrenalina inhibă secreţia de insulină şi în acest mod îngreuiază utilizarea glucozei sanguine de către ţesuturile insulino-sensibile. În acest fel are loc o economisire a glucozei şi dirijarea ei spre creier care nu poate utiliza alte substanţe energetice.

Glucocorticoizii, al căror reprezentant major este cortizolul (hidrocortizonul), intervine în mecanismul homeostatic de reglare a glicemiei prin accelerarea dislocării proteinelor tisulare, în special a celor din ficat şi din muşchi care furnizează aminoacizi ca substrate gluconeogenetice. În inaniţie, după epuizarea rezervelor de glicogen, sinteza glucozei din aminoacizi reprezintă singura cale de întreţinere a glicemiei.

7. METABOLISMUL FRUCTOZEI

Fructoza pătrunde în organism pe calea tractului gastro-intestinal. Alimentele cuprind fructoză atît în stare liberă cît şi sub formă de oligozaharide sau polizaharide vegetale. Fructoza provenind din zaharoză reprezintă pentru om sursa principală de fructoză.

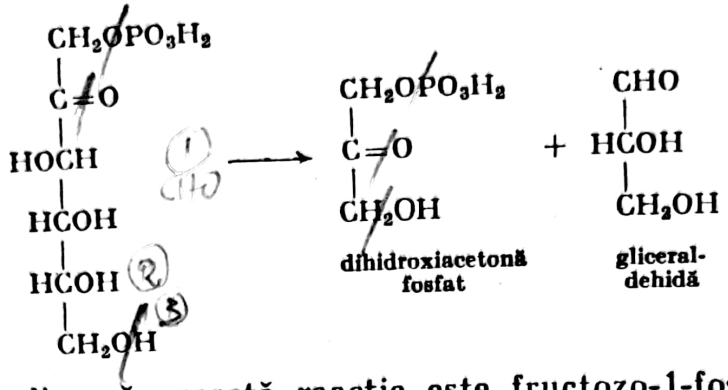
Fructoza exogenă nu ajunge în circulaţia sistemică, fiind convertită în glucoză sau în metaboliţi ai secvenţei Embden-Meyerhof atît în celulele mucoasei intestinale cît şi în ficat. Metabolizarea fructozei are loc astfel:

a) Fructoza este fosforilată printr-o reacţie catalizată de o enzimă specifică (fructokinază) distinctă de kinazele care fosforilează glucoza la glucozo-6-fosfat (hexokinază sau glucokinază):

Fructoză + ATP → fructoză-1-fosfat + ADP

Scanned with OKEN Scanner

b) Fructozo-1-fosfatul este scindat printr-o reacţie de retroaldolizare în două trioze:



Enzima care catalizează această reacţie este fructozo-1-fosfat aldolaza.

c) Dihidroxiacetono-fosfatul intră în secvenţa Embden-Meyerhof direct, fiind un intermediar al acestei căi metabolice, pe cînd gliceraldehida suferă în prealabil o fosforilare:

gliceraldehidă + ATP → gliceraldehidă-3-fosfat + ADP

d) Cei doi triozo-fosfaţi pot urma mai departe calea degradativă Embden-Meyerhof pînă la acid piruvic şi la acid lactic sau pot servi la gluconeogeneză. În condiţiile absorbtive cînd fructoza pătrunde în organism este mult mai probabilă transformatea fructozei în glucoză şi depozitarea ei sub formă de glicogen. Ficatul metabolizează fructoza rapid, chiar mai rapid decît este utilizată glucoza, probabil prin ocolirea reacţiei limitative a secvenţei Embden-Meyerhof, reacţia catalizată de fosfofructokinază.

În legătură cu metabolizarea fructozei s-a descris maladia genetică — intoleranţa ereditară la fructoză — caracterizată prin incapacitatea organismului de a utiliza fructoza. Defectul metabolic constă în absenţa enzimei care scindează fructozo-1-fosfatul în trioze (aldolaza), etapă specifică acestei căi metabolice. Substratul enzimei deficiente se acumulează în ficat şi exercită acţiuni inhibitorii asupra glucozo-6-fosfatazei, enzimă responsabilă de eliberarea glucozei în circulaţie. La bolnavii cu acest defect metabolic se instalează hipoglicemii pronunţate după ingerare de fructoză sau de zaharoză.

O altă maladie genetică a metabolismului fructozei este determinată de absenţa enzimei care fosforilează fructoza (fructokinaza). În aceste condiţii fructoza liberă se acumulează în organism după care este eliminată prin urină (fructozurie).

8. METABOLISMUL GALACTOZEI

După glucoză, galactoza este una din hexozele care joacă roluri importante în organismul omului şi al altor mamifere.

— Galactoza intră în constituţia unor lipide complexe, cerebrozide, gangliozide.

— Sub formă de galactozamină sau de galactoză este un component al mucopolizaharidelor.

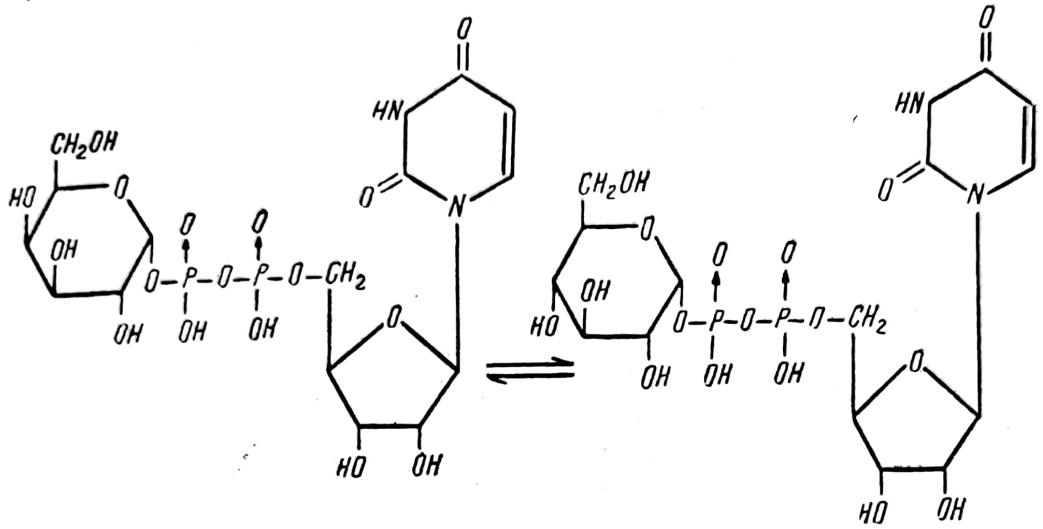
— Împreună cu glucoza formează dizaharidul lactoză, zahărul din laptele mamiferelor.

Organismul obţine galactoza necesară acestor scopuri pornind de la glucoză. Galactoza exogenă este utilizată în acest scop numai într-o măsură

Scanned with OKEN Scanner

extrem de redusă, cea mai mare parte fiind transformată în glucoză la nivelul ficatului.

Glucoza şi galactoza sînt interconvertibile, sensul în care are loc reacţia depinde de necesităţile organismului şi de particularităţile tisulare. Galactoza şi glucoza sînt compuşi epimeri, moleculele lor diferă doar prin configuraţia atomului C_4. Schimbarea configuraţiei acestui atom asimetric are loc la nivelul derivaţilor UDP-glucoză sau UDP-galactoză şi este catalizată de o epimerază:



UDP-galactoză *UDP-glucoză*

Transformarea glucoză⇌galactoză. Această reacţie are loc în scopul de a furniza organismului galactoza necesară sintezei de galactolipide şi de mucopolizaharide, iar la femeile care alăptează cantităţi mari de galactoză sînt necesare pentru sinteză de lactoză. În acest scop glucoza este transformată în UDP-glucoză, după care are loc epimerizarea:

UDP-glucoză ⇌ UDP-galactoză

Galactoza nu este eliberată din UDP-galactoză ea fiind utilizată în sinteze sub această formă.

Transformarea galactoză⇌glucoză. Această cale metabolică devine importantă în situaţiile cînd raţia alimentară cuprinde cantităţi mari de lapte, sursa principală de galactoză exogenă. La sugari laptele fiind singurul lor aliment, transformarea galactozei în glucoză este un proces deosebit de important.

Galactoza este transformată în glucoză la nivelul ficatului astfel încît sîngele sistemic nu cuprinde galactoză. Etapa cheie a utilizării galactozei este transformarea sa în UDP-galactoză, asupra căreia acţionează apoi epimeraza. Activarea galactozei la UDP-galactoză are loc prin reacţiile:

(a) galactoză + ATP → galactoză-1-fosfat + ADP
catalizată la galactokinază

(b) galactoză-1-fosfat + UDP-glucoză → glucoză-1-fosfat + UDP-galactoză
catalizată de galactoză-1-fosfat → uridil transferază.

Alături de reacţia (b) mai există o cale auxiliară de sinteză a UDP-galactozei, dar aceasta devine operantă mai tîrziu în cursul vieţii:

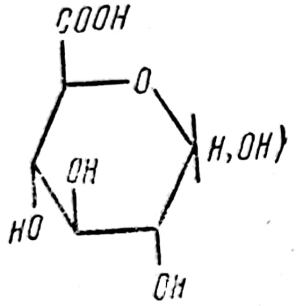
(b′) galactoză-1-fosfat + UTP → UDP-galactoză + PP_i

Scanned with OKEN Scanner

În legătură cu utilizarea galactozei exogene este cunoscută o boală ereditară gravă şi destul de răspîndită denumită galactozemie. Boala este caracterizată prin acumularea galactozei şi a galactozo-1-fosfatului în celule şi în lichidele din organism, determinînd leziuni nervoase, hepatice, cataractă. Defectul metabolic este situat la nivelul enzimei galactozo-1-fosfat→uridil transferază fiind blocată conversia galactozei în glucoză.

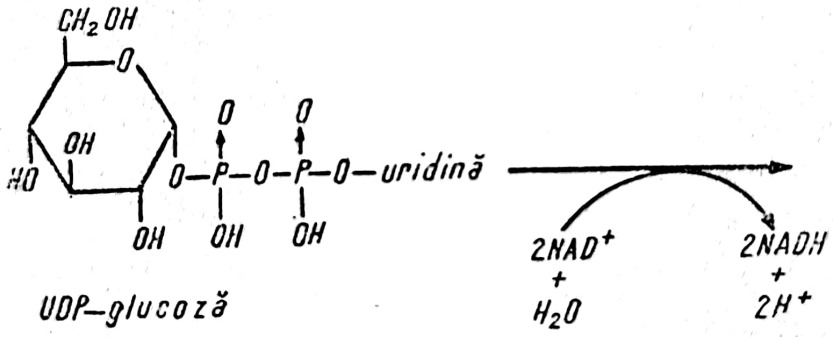
9. METABOLISMUL ACIDULUI GLUCURONIC

La om şi la alte mamifere acidul glucuronic îndeplineşte două roluri importante: intră în constituţia mucopolizaharidelor şi în al doilea rînd, formează derivaţii cunoscuţi sub denumirea de glucurono-conjugaţi (glucuronide). Acidul glucuronic necesar sintezei acestor compuşi este obţinut din glucoză sub forma derivatului UDP-glucuronat. Acidul glucuronic liber se formează în cantităţi foarte mici în organismul omului.

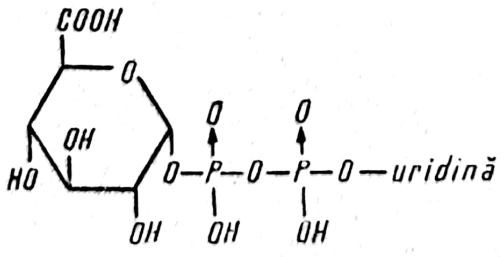


Acid glucuronic

Plecîndu-se de la UDP-glucoză obţinerea UDP-glucuronatului implică oxidarea grupării alcoolice primare de la C_6 la —COOH, reacţie catalizată de o dehidrogenază (UDP-glucozo-dehidrogenază) care funcţionează cu NAD^+ drept acceptor pentru hidrogen:



UDP—glucoză



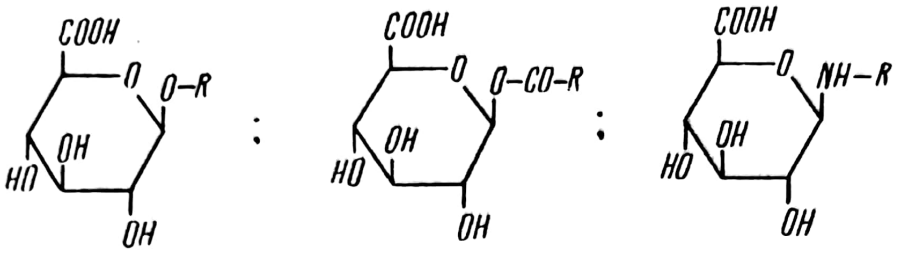
UDP—glucuronat

Această reacţie are loc în cea mai mare parte în ficat şi mai puţin în intestin şi în rinichi.

În UDP-glucuronat radicalul glucuronil este activ şi poate fi uşor transferat pe diverşi acceptori. La sinteza de mucopolizaharide şi a glucurono-conjugaţilor unităţile glucuronil sînt furnizate de UDP-glucuronat.

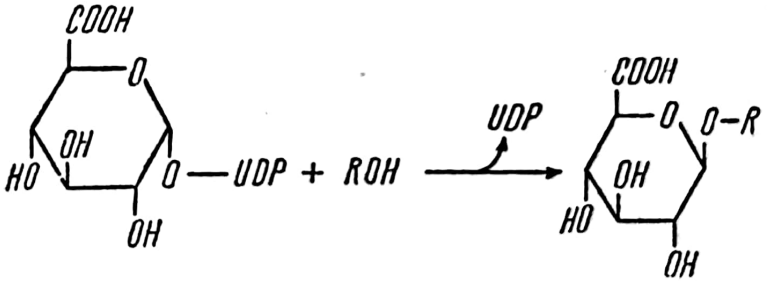
Scanned with OKEN Scanner

Glucuronoconjugaţii sînt derivaţi de natură glicozidică (glucuronide), rezultaţi prin condensarea acidului glucuronic cu un compus cu funcţie hidroxil, carboxil sau aminică. Compuşii naturali de acest fel au configuraţii β, sînt β-glucuronide:



Glucuronidele prin gruparea —COOH pe care o posedă (la C_6) sînt compuşi ionizaţi şi uşor solubili în apă. Conjugarea cu acidul glucuronic reprezintă o modalitate de a transforma diverşi compuşi cu polarităţi reduse în derivaţi solubili, uşor de transportat şi de eliminat din organism. Totodată prin blocarea unor grupări funcţionale activitatea metabolică a acestor compuşi poate fi anulată sau diminuată. Conjugarea cu acidul glucuronic este utilizată atît pentru transportul şi inactivarea unor compuşi endogeni (hormoni, bilirubină), cît şi pentru metabolizarea unor substanţe străine, medicamente, toxice.

Glucuronoconjugarea unui compus are loc prin transferul grupării glucuronil din UDP-glucuronat pe molecula acceptor:



β-glucuronid

Legătura glucozidică din UDP-glucuronat fiind α- iar cea din glucuronoconjugat fiind β-glicozidică reacţia este ireversibilă. Enzimele care catalizează astfel de reacţii sînt UDP-glucuronil transferaze şi au specificităţi de substrat destul de largi. Enzimele se găsesc în ficat. La naştere activitatea glucuronil transferazelor este redusă dar creşte repede în primele zile de viaţă, ca după 7—10 zile să atingă deja activitatea specifică (activitate raportată la g ţesut) pe care o prezintă şi adultul. Capacitatea scăzută de detoxifiere a ficatului în primele zile de la naştere face ca unele medicamente să aibă efecte dăunătoare dacă sînt administrate în mod necorespunzător.

Un compus endogen vehiculat în organism sub formă de glucuronoconjugat este bilirubina care formează un diglucuronid. Bilirubina se formează prin degradarea hemoglobinei în celulele reticulohistiocitare din splină şi din ficat şi este eliminată prin bilă după conjugarea sa în ficat. Activitatea redusă a glucuronil-transferazelor la făt şi la nou-născut explică

Scanned with OKEN Scanner

icterul fiziologic al nou-născuţilor. Bilirubina neconjugată se acumulează în sînge şi în ţesuturi determinînd colorarea ţesuturilor în galben. În cazurile în care există incompatibilitate între sîngele mamei şi al copilului are loc o distrugere masivă a hematiilor şi formarea de cantităţi excesive de bilirubină. Deoarece activitatea glucuronil transferazică este scăzută se ajunge la stări icterice foarte grave (icter hemolitic).

Organismele diverselor specii animale (cu excepţia omului, a maimuţelor antropoide şi a cobaiului) pornind de la acidul glucuronic obţin acidul ascorbic (fig. IX.12). La om şi alte cîteva mamifere această cale biosintetică este inoperantă prin absenţa enzimei de oxidare a gulono lactonei şi acidul ascorbic (vitamina C) este obţinut numai prin aport exogen. Reacţiile acestei secvenţe metabolice anterioare blocului enzimatic au loc şi în ţesuturile omului dar de la nivelul acidului L-gulonic evoluează pe o cale alternativă care duce la obţinerea unei pentoze (xiluloză). Considerîndu-se că acidul glucuronic este obţinut din glucoză şi că pentoza este integral reconvertită în hexoză, această secvenţă de reacţii reprezintă o modalitate de oxidare directă a glucozei la bioxid de carbon (calea glucuronatului) similară cu calea fosfogluconatului. Nu se cunoaşte însă contribuţia acestei căi metabolice la om. Funcţionarea sa este susţinută de constatarea că unii subiecţi excretă prin urină cantităţi mari de L-xiluloză (pentozurie esenţială). Defectul metabolic este situat la nivelul xilitol dehidrogenazei NADP-dependentă prin blocarea conversiei L-xilulozei în D-xiluloză, via xilitol, un compus simetric. L-xiluloza nu poate intra în secvenţele metabolice ale zaharurilor normale ce aparţin seriei D, se acumulează în ţesuturi şi este eliminată prin urină.

10. MUCOPOLIZAHARIDELE (GLICOZAMINOGLICANII)

Această clasă de polizaharide este specifică organismelor animale, ea lipseşte la plante. Mucopolizaharidele sînt compuşi extracelulari şi alcătuiesc substanţa fundamentală a tuturor tipurilor de ţesuturi conjunctive. Sînt macromolecule lineare care reţin cantităţi mari de apă datorită prezenţei unui număr mare de grupări acide ionizate ($-COO^-$ şi $-O-SO_3^-$). Formează soluţii coloidale, geluri, care realizează un ciment intercelular flexibil, cu proprietăţi lubrefiante şi antişoc. În substanţa fundamentală a ţesutului conjunctiv se află cea mai mare parte din conţinutul total de apă al organismului. Diversele mucopolizaharide sînt asociate cu proteine, atît prin legături ionice cît şi prin legături covalente.

Mucopolizaharidele sînt alcătuite din două tipuri de unităţi glicozil care alternează în mod regulat în lungul moleculei (heteroglicani). Aceste unităţi glicozil provin de la acizii uronici (acid glucuronic, acid iduronic) şi de la hexozamine (glucozamină şi galactozamină). Grupările aminice ale hexozaminelor sînt frecvent acetilate. Unele polizaharide cuprind şi resturi sulfat $-SO_3H$ legate esteric sau amidic.

Scanned with OKEN Scanner

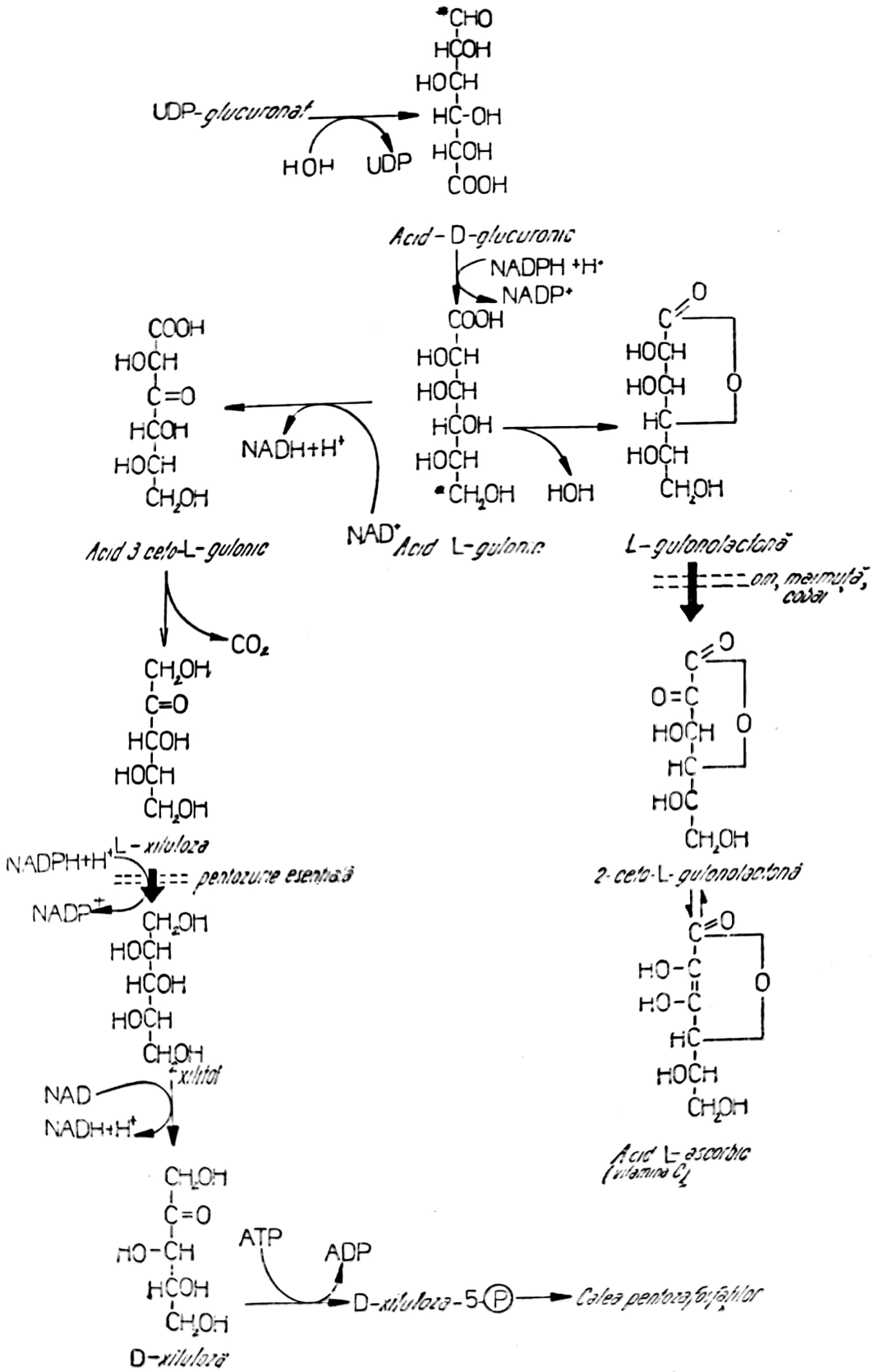


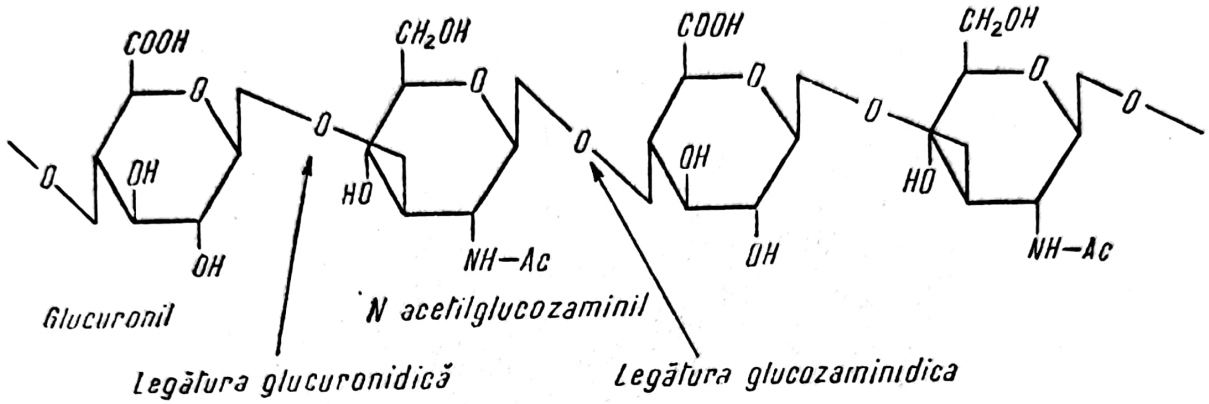
Fig. IX.12. Calea glucuronatului.

Scanned with OKEN Scanner

Mucopolizaharidele cele mai răspîndite şi mai abundente sînt:

Acidul hialuronic. Este prezent în toate ţesuturile conjunctive în concentraţii cuprinse între 0,1 şi 1 g%. Este foarte abundent în lichid sinovial, în umoarea vitroasă a ochiului, în cordonul ombilical.

Acidul hialuronic este constituit din resturi de acid glucuronic şi de N-acetil-glucozamină care sînt legate alternativ prin legături β-(1→3)-glucuronidice şi legături β-(1→4)-glucozaminidice. În formula de mai jos este redat un fragment din macromolecula de acid hialuronic:

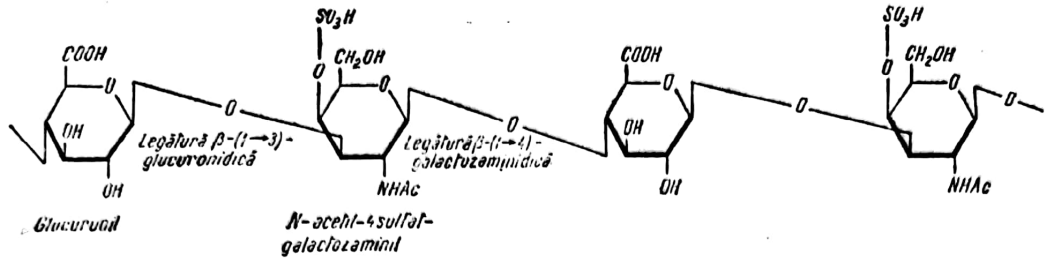


Greutatea moleculară a acidului hialuronic in vivo nu este cunoscută, ea variază după natura ţesutului de origine şi a tehnicii de izolare şi purificare a preparatului, putînd să ajungă pînă la cîteva milioane. Moleculele sînt lungi de cîteva mii de angstromi şi subţiri (30—50 Å). Unitatea repetitivă a macromoleculei este de 11,98 Å. Cuprinde un număr foarte mare de grupări —COOH care la pH-urile fiziologice sînt ionizate complet. Sarcinile (—) sînt repartizate uniform în lungul moleculei la distanţa de 10 Å. Aceste sarcini conferă moleculelor de acid hialuronic caracter hidrofil pronunţat ceea ce face ca ele să fie uşor solubile în apă. Soluţiile au vîscozităţi mari, moleculele sînt difuze şi ocupă volume foarte mari în comparaţie cu alte macromolecule de aceeaşi greutate. La concentraţiile de 0,1—1 g%, valori ce corespund concentraţiilor fiziologice, moleculele de acid hialuronic formează reţele tridimensionale. Grupările $—COO^-$ echidistante, prin repulsii electrostatice, asigură acestor reţele o structură cvasirigidă, în ochiurile reţelelor fiind reţinute cantităţi mari de apă.

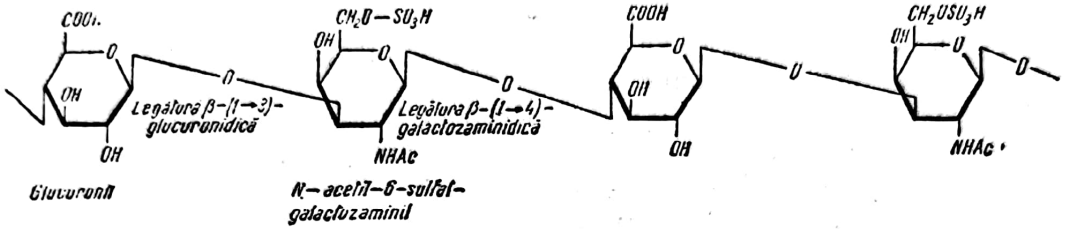
Condroitin-sulfaţii. Aceste mucopolizaharide, condroitin-4-sulfat (condroitin-sulfat A) şi condroitin-6-sulfat (condroitin-sulfat C) sînt componenţii principali ai ţesutului conjunctiv din cartilaje, vase, tendoane, piele. Ţesutul nediferenţiat cicatriceal (ţesutul granular) cuprinde cantităţi mari de condroitinsulfaţi.

Condritin-sulfaţii cuprind resturi de acid glucuronic care alternează cu resturi de N-acetil-galactozamină. Legăturile care reunesc unităţile glicozil sînt β-(1→3)-glucuronidice şi β-(1→4)-galactozaminidice. Aceste mucopolizaharide mai cuprind cîte o grupare ester sulfurică pentru fiecare unitate galactozaminil. Cei doi controitin-sulfaţi diferă prin poziţia grupării $—O—SO_3H$ care se află la C_4 în condroitin sulfatul A şi la C_6 în controitin-sulfatul C. Structurile acestor polizaharide sînt arătate mai departe:

Scanned with OKEN Scanner



Condroitin-4-sulfat

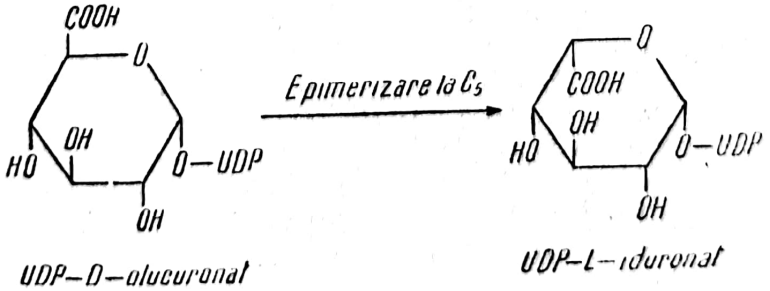


Condroitin-6-sulfat

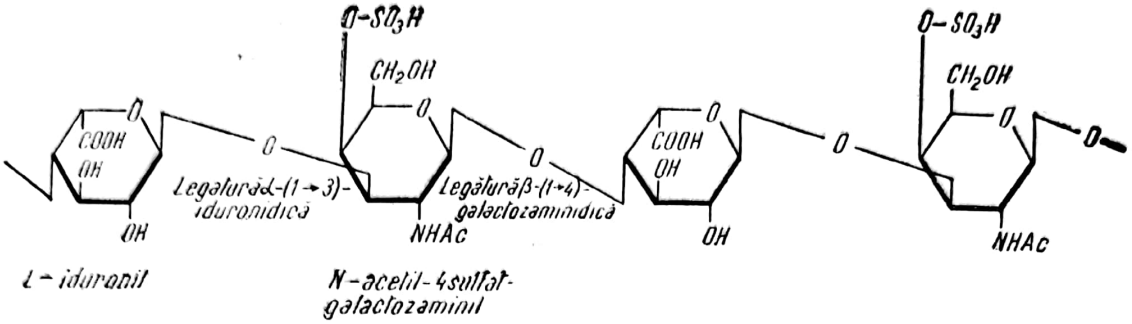
Condrointin-sulfaţii se află împreună în ţesuturi dar condroitin-4-sulfatul este mult mai abundent decît celălalt. Asociaţiile dintre condroitin sulfaţi şi proteine, denumite condroproteine, reprezintă unităţi structurale şi funcţionale distincte care se sintetizează şi se degradează împreună.

Controitin-sulfaţii au greutăţi moleculare destul de mari, dar totuşi mai mici decît ale acidului hialuronic. Sînt compuşi cu un caracter acid puternic datorită resturilor de acid sulfuric. La pH-urile fiziologice sînt ionizate toate grupările $-OSO_3H$ şi $-COOH$. Frecvenţa sarcinilor negative în condroitin-sulfaţi este mai mare decît la acidul hialuronic. Distanţa între două sarcini fiind de numai 5 Å faţă de 10 Å în acidul hialuronic. Condroitin-sulfaţii sînt uşor solubili în apă; soluţiile lor la aceleaşi concentraţii au vîscozităţi mai mici decît soluţiile de acid hialuronic. Condroitin-sulfaţii joacă roluri importante la metabolismul calciului în os, sarcinile negative ale acestui polizaharid putînd lega un număr mare de cationi Ca^{2+}.

Dermatan sulfatul (nume vechi condroitin-sulfat B). Acest polizaharid întovărăşeşte condroitin-sulfaţii în cartilaje, vase, tendoane. Se află în piele în cantităţi mai mari decît alte mucopolizaharide. O particularitate a acestui polizaharid: concentraţia sa în ţesuturi creşte cu vîrsta în dauna celorlalte mucopolizaharide. Structural se aseamănă cu condroitin-4-sulfatul, cu deosebirea că în locul restului de acid D-glucuronic cuprinde un rest de acid L-iduronic, legat de unitatea adiacentă printr-o legătură α-(1→3)-iduronidică. Acidul L-iduronic se formează prin schimbarea configuraţiei atomului C_5



din acidul glucuronic ceea ce deplasează zahărul din seria D în seria L. Un fragment din molecula dermatan-sulfatului este arătată mai jos:



Cheratan-sulfatul (cheratosulfatul). Acest mucopolizaharid a fost izolat mai întîi din corneea bovinelor dar se află şi în alte ţesuturi conjunctive. Este de remarcat prezenţa sa în cartilajele costale şi în nucleul pulpos al discurilor intervertebrale. S-a mai constatat creşterea cu vîrsta a concentraţiei tisulare a cheratan-sulfatului, constatare căreia i s-a acordat o importanţă deosebită în procesul de îmbătrînire.

Cheratan-sulfatul are o structură analogă cu a celorlalte mucopolizaharide deosebindu-se de acestea prin absenţa resturilor de acid uronic care sînt înlocuite cu grupări galactozil, iar hexozamina este în acest caz glucozamină sulfatată în poziţia 6.

Heparan-sulfatul (heparitin sulfat). Mucopolizaharid distribuit predominant în aortă, ficat, plămîni. Componenta uronică este acidul glucuronic iar cea hexozaminică este glucozamina parţial N-acetilată şi parţial N-sulfatată.

Heparina. Este un polizaharid cu greutate moleculară mică de aproximativ 15 000—20 000. Se află în diverse ţesuturi şi lichide din organism. Este sintetizată de către toate ţesuturile care cuprind mastocite. Este cunoscută şi utilizată în terapeutică ca substanţă anticoagulantă.

Structura sa este incomplet cunoscută. Cuprinde glucozamină sulfatată la azot şi în alte poziţii, precum şi acid glucuronic. Are în structură un mare număr de resturi de sulfat, cîte 1,5 resturi per unitate glicozil. Dacă se socoteşte şi gruparea —COOH din resturile de acid glucuronic rezultă că în heparină există cîte două grupări acide per unitate glicozil, de două ori mai mult decît în condroitin sulfaţi.

Heparina este puternic hidrofilă, uşor solubilă în apă şi soluţiile nu au vîscozităţi mari. Acţiunea anticoagulantă a heparinei este în legătură cu prezenţa grupărilor sulfat. Prezenţa acestor grupări acide face posibilă legarea de către heparină a unor amine cu acţiuni farmacologice puternice — histamina şi serotonina — ceea ce ar putea fi o explicaţie a rolului acestui mucopolizaharid.

Sinteza mucopolizaharidelor. Mucopolizaharidele au roluri plastice şi sinteza lor reprezintă o fracţiune importantă din activitatea biosintetică a organismului. Ele sînt sintetizate în celulele diverselor ţesuturi conjunctive (fibroblaşti, osteoblaşti, mastocite) şi apoi sînt exportate în spaţiul intercelular.

Materia primă care furnizează toate resturile glicozil ale acestor polizaharide este glucoza. Transformarea glucozei în diversele zaharuri ce intră în constituţia mucopolizaharidelor este prezentată schematic în fig. IX.13. Trebuie subliniat că în aceste reacţii se formează derivaţii UDP-zahar, care sînt donorii de grupări glicozil active. Formarea UDP-glucuronatului, a

Scanned with OKEN Scanner

UDP-galactozei au fost prezentate mai detaliat în subcapitolul anterior. La formarea hexozaminelor grupările $-NH_2$ sînt furnizate de glutamină.

Unităţile glicozil din derivaţii UDP-zahar sînt legate alternativ la capetele nereducătoare ale unor lanţuri polizaharidice incipiente prin participarea a două tipuri de enzime cu specificităţi distincte pentru realizarea legăturilor

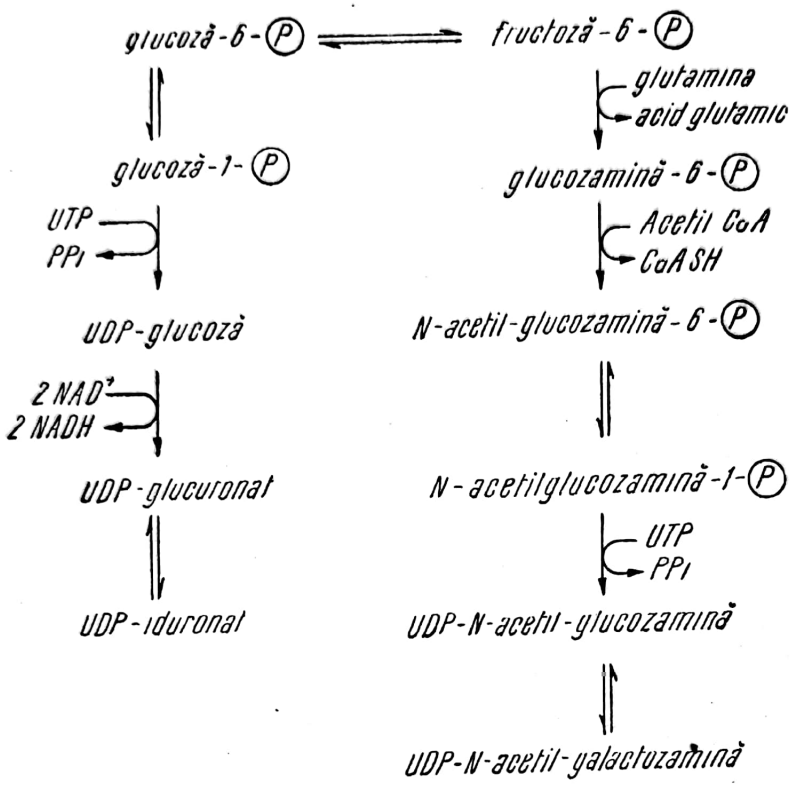
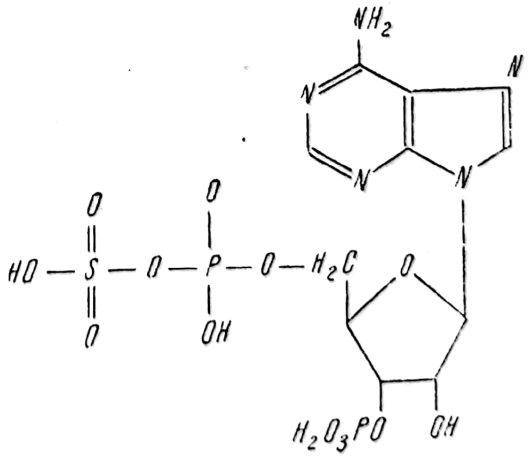


Fig. IX.13. Sinteza derivaţilor UDP-zahar utilizaţi la sinteza mucopolizaharidelor.

uronidice şi respectiv hexozaminidice. Introducerea resturilor sulfat are loc după constituirea lanţului polizaharidic. Forma activă a acidului sulfuric este derivatul fosfoadenozin-fosfosulfat (PAPS) în care acidul sulfuric este legat anhidridic de un rest de acid fosforic. Acest compus se obţine pornindu-se de la ATP:

$$H_2SO_4 + 2ATP \rightarrow PP_1 + ADP + PAPS$$



3 - fosfo - adenozin - 5 - fosfosulfat

Degradarea mucopolizaharidelor. Acidul hialuronic şi condroitin-sulfaţii, mucopolizaharidele cele mai abundente, cuprind alternativ legături glucoronidice şi legături hexozaminidice (glucozaminidice şi galactozaminidice) şi acestea sînt scindate sub acţiunea unor enzime specifice.

Hialuronidaza este una din enzimele cu funcţii importante în catabolismul

Scanned with OKEN Scanner

mucopolizaharidelor. A fost identificată inițial la bacterii dar apoi s-a stabilit că este ubicuitară. Scindează hidrolitic legăturile hexozaminidinice din acidul hialuronic și din condroitin sulfați. Acționează în interiorul lanțurilor scindînd mucopolizaharidele în fragmente cu greutăți moleculare din ce în ce mai mici. Prin acțiunea exhaustivă a hialuronidazei asupra acidului hialuronic sau a condroitin sulfaților se obțin dizaharide și tetrazaharide (legăturile uronidice nu sînt atacate de hialuronidază). Prin reducerea dimensiunii moleculelor vîscozitatea gelurilor de acid hialuronic scade devenind posibilă pătrunderea unor compuși sau corpuri străine în spațiile intercelulare. Liberarea hialuronidazei de către bacterii în țesuturile infectate facilitează răspîndirea acestora în organism.

Oligozaharidele rezultate prin acțiunea hialuronidazei sînt scindate în continuare de o β-glucuronidază și o oligo-glucozaminidază (sau oligo-galactozaminidază), formîndu-se monozaharide. Transformările ulterioare ale acestor compuși sînt puțin cunoscute.

Scanned with OKEN Scanner

Capitolul X

METABOLISMUL LIPIDELOR

1. CHIMIA LIPIDELOR

Această clasă reunește componenți ai materiei vii cu constituții chimice variate dar care se aseamănă prin caractere comune de solubilitate: sînt greu solubile în apă dar se dizolvă ușor în solvenți nepolari (cloroform, eter, benzen). Sînt compuși foarte răspîndiți în lumea vie, fiind forma principală de depozitare a rezervelor de materiale energetice ale organismelor. Lipidele în asociație cu proteinele și într-o mai mică măsură cu zaharurile sînt componente structurale fundamentale ale celulelor. La animale, prin localizarea subcutană și în jurul organelor vitale, lipidele au roluri protectoare.

Din punct de vedere chimic cele mai multe categorii de lipide cuprind acizi alifatici superiori — acizi grași — legați esteric sau amidic și prin hidroliză sînt descompuse în substanțe mai simple (lipide saponifiabile). Există însă și compuși cu caracterele de solubilitate specifice lipidelor dar care nu sînt scindate hidrolitic în altele mai simple (lipide nesaponifiabile). Datorită heterogenității lor chimice, clasificarea lipidelor este mai mult sau mai puțin arbitrară, fapt ce explică multitudinea sistemelor de clasificare. Unul dintre acestea este următorul:

A. Lipidele simple — esteri ai acizilor grași cu alcooli. După natura alcoolului se disting:

— gliceride (acilgliceroli), esteri ai glicerolului cu acizi grași;
— ceride, esteri ai unor alcooli alifatici superiori cu acizi grași;
— steride, esteri ai acizilor grași cu alcooli ciclici superiori, steroli;
— carotenoceride, esteri ai acizilor grași cu alcooli din clasa carotenoizilor.

B. Lipidele complexe — sînt lipide la formarea cărora alături de acizii grași, mai praticipă acidul fosforic, alcooli azotați, zaharuri. Principalele subclase de lipide complexe sînt:

— fosfatidele sau glicerofosfatidele, alcătuite din glicerol, acizi grași, acid fosforic și un compus azotat;
— sfingolipidele, derivați ai unui alcool aminat alifatic, sfingozina (sfingol).

C. Lipidele derivate — clasă în care sînt incluși compuși care rezultă prin hidroliza lipidelor simple sau complexe și care mai păstrează caracterele de solubilitate specifice lipidelor. Uneori aceste lipide se află ca atare în organismele vii (lipide nesaponifiabile).

Principalele categorii de lipide derivate sînt:

— acizii grași
— alcoolii alifatici superiori

Scanned with OKEN Scanner

— steroizii
— carotenoizii
— vitaminele liposolubile.

1.1. ACIZII GRAŞI

Acizii graşi sînt componenţi fundamentali ai multor categorii de lipide. În lipidele izolate de la diverse specii au fost identificaţi cca 70 de acizi diferiţi. Totuşi acizii graşi tipici, cei mai răspîndiţi şi mai abundenţi, au anumite caractere comune: *sînt acizi monocarboxilici alifatici, cu catenă normală, saturată sau nesaturată şi cuprind un număr pereche de atomi de carbon* (de la 4 la 30 atomi de carbon). Acizii graşi, ciclici, cu catenă ramificată sau cu un număr impar de atomi de carbon apar în natură doar ocazional.

Acizii graşi saturaţi pot fi redaţi prin formula generală $CH_3-(CH_2)_n-COOH$, unde n este cuprins între 2 şi 28. Acizii saturaţi cei mai răspîndiţi în grăsimile animale sînt acidul palmitic (C_{16}) şi acidul stearic (C_{18}):

$CH_3-(CH_2)_{14}-COOH$ acid palmitic

$CH_3-(CH_2)_{16}-COOH$ acid stearic

Acidul lignoceric (C_{24}) se află în cantităţi apreciabile în unele lipide din substanţa nervoasă (cerebrozide). Acizii inferiori C_4-C_{10} sînt abundenţi în grăsimile din laptele rumegătoarelor. Laptele uman cuprinde numai urme din aceşti acizi.

Acizii graşi nesaturaţi cuprind una sau mai multe legături etilenice. Cei mai răspîndiţi acizi nesaturaţi sînt acizii palmitoleic, oleic, linoleic, arahidonic. Aceşti acizi sîn caracterizaţi prin lungimea catenei hidrocarbonate (C_n) şi prin poziţia dublei (sau a dublelor) legături, care este specificată prin numărul atomului de carbon de la care porneşte ($C_{n:m}$).

Acidul palmitoleic ($C_{16:9}$) : $CH_3-(CH_2)_5-CH=CH-(CH_2)_7-COOH$. Este foarte răspîndit atît la animale, cît şi în grăsimile vegetale. În cantităţile cele mai mari se obţine din grăsimile animalelor marine.

Acidul oleic ($C_{18:9}$): $(CH_3-(CH_2)_7-CH=CH-(CH_2)_7-COOH$. Este unul din acizii graşi cei mai abundenţi în grăsimile animale sau vegetale.

Acidul linoleic ($C_{18:9,12}$): $CH_3-(CH_2)_4-CH=CH-CH_2-CH=CH-(CH_2)_7-COOH$. Este cuprins în toate grăsimile de origine animală dar în cantităţi mai mici. Este deosebit de abundent în unele uleiuri vegetale (uleiul de in).

Acidul linolenic ($C_{18:9,12,15}$): $CH_3-CH_2-CH=CH-CH_2-CH=CH-CH_2-CH=CH-(CH_2)_7-COOH$. Se găseşte în urme în grăsimile animale; întovărăşeşte însă acidul linoleic în uleiurile vegetale.

Acidul arahidonic ($C_{20:5,8,11,14}$): $CH_3-(CH_2)_4-CH=CH-CH_2-CH=CH-CH_2-CH=CH-(CH_2)_3-COOH$. Se află în cantităţi mici, doar în grăsimile animale.

La acizii nesaturaţi prezenţa dublei legături permite o aranjare în cis sau în trans a substituenţilor carbonilor etilici. Acizii mono- sau polietilenici naturali sînt totdeauna izomeri cis. Această configuraţie spaţială scurtează

Scanned with OKEN Scanner

lungimea catenei hidrocarbonate, mai ales la compușii cu mai multe legături duble, fapt cu consecințe importante la asocierea dintre lipide și proteine.

Proprietățile acizilor grași. Acizii saturați inferiori sînt lichizi, cei superiori (cu mai mult de 12 atomi de carbon) sînt solizi. Acizii nesaturați sînt lichizi.

Acizii grași sînt puțin solubili în apă, cu atît mai puțin solubili cu cît au o catenă hidrocarbonată mai lungă. Sărurile acizilor grași — săpunurile — cuprinzînd o sarcină electrică la ionul carboxilat au un caracter polar mult mai pronunțat și interacționează cu apa formînd soluții micelare. Prin încorporarea în interiorul miceliilor a altor substanțe nepolare sau a unor particule hidrofobe săpunurile au acțiuni detergente puternice.

Din punct de vedere chimic acizii grași dau reacțiile caracteristice funcției carboxil. Acizii nesaturați mai prezintă și proprietățile conferite de legăturile etilenice: proprietatea de a adiționa hidrogen, halogeni și de a suferi un proces de oxidare spontană în aer (autoxidare sau peroxidare). Aceste reacții ale catenei hidrocarbonate din resturile de acid gras sînt întîlnite și la grăsimi și de aceea ele vor fi examinate acolo.

1.2. GLICERIDELE (ACILGLICEROLI SAU GRĂSIMI NEUTRE)

Sînt lipidele cele mai abundente din natură. Sînt componentele principale ale grăsimilor de rezervă din țesuturi și ale grăsimilor din lapte. În cantități foarte mici și în proporții bine determinate se află alături de alte categorii de lipide în structurile celulare.

Sînt esteri ai glicerinei (glicerolului) cu acizii grași, acil-gliceroli. După numărul grupărilor alcoolice esterificate pot fi monogliceride (monoacil-gliceroli), digliceride (diacil-gliceroli) și trigliceride (triacil-gliceroli):

CH_2OCOR	CH_2OH	CH_2OCOR	CH_2OCOR	CH_2OCOR
|	|	|	|	|
$CHOH$	$CHOCOR$	$CHOCOR$	$CHOH$	$CHOCOR$
|	|	|	|	|
CH_2OH	CH_2OH	CH_2OH	CH_2OCOR	CH_2OCOR
α-monoglicerid (1-acil-glicerol)	β-monoglicerid (2-acil-glicerol)	α, β-diglicerid (1,2-diacil-glicerol)	α, α'-diglicerid (1,3-diacil-glicerol)	triglicerid (triacil-glicerol)

Grăsimile naturale sînt compuse aproape exclusiv din trigliceride. Mono- și digliceridele sînt intermediari în cursul degradării și sintezei trigliceridelor și se găsesc doar în cantități mici în țesuturi. Se formează în tubul digestiv în cursul digestiei grăsimilor.

Trigliceridele naturale există într-o varietate foarte mare, diferențiindu-se atît prin natura acizilor grași constituenți, cît și prin aranjarea lor în interiorul moleculei. Trigliceridele simple ca tristearină, trioleină, apar în cantități mici. Există tendința ca diferiții acizi grași care iau parte la formarea trigliceridelor să se răspîndească cît mai uniform în toate moleculele, formînd trigliceride mixte. Această tendință de distribuție a acizilor grași explică heterogenitatea moleculară a trigliceridelor naturale.

Trigliceridele din țesutul adipos uman cuprind, în procente din greutate, următorii acizi grași: acid oleic (45%), acid palmitic (25%), acid linoleic (8%), acid palmitoleic (7%), acid stearic (7%) și alții (8%). Uleiurile vegetale sînt bogate în acizi nesaturați, acid oleic, linoleic, linolenic.

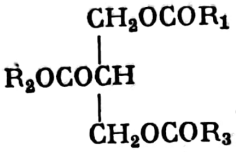
Proprietăți fizice. Starea de agregare a trigliceridelor depinde de compoziția lor în acizi grași: cele bogate în acizi saturați inferiori sau acizi nesaturați sînt lichide; cu cît conținutul în acizi grași saturați superiori este mai mare,

Scanned with OKEN Scanner

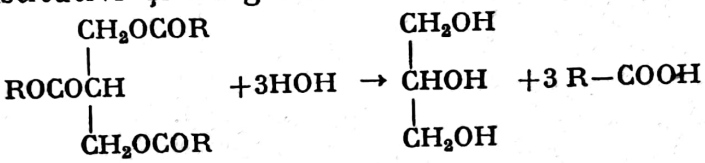
cu atît punctul de topire al unei trigliceride este mai ridicat. Grăsimile naturale sînt amestecuri de diverse trigliceride şi nu pot fi caracterizate prin constante fizice nete. La încălzire ele se înmoaie treptat pînă la topire.

Trigliceridele au densităţi mai mici decît apa. Sînt substanţe insolubile în apă avînd un caracter aproape perfect nepolar. Puse pe suprafaţa apei se întind dar nu pot interacţiona cu apa. Digliceridele, dar mai ales monogliceridele, datorită prezenţei grupărilor hidroxil au proprietăţi amfipatice. Ele nu se dizolvă în apă, în schimb apa poate pătrunde printre grupările polare formînd structuri în care alternează straturi duble de monogliceride cu straturi de apă.

Trigliceridele care cuprind trei resturi acil diferite au un carbon asimetric (C_2 din glicerol) şi vor putea exista sub forma a doi enantiomeri. Substanţele naturale au toate aceeaşi configuraţie, care este redată cu ajutorul formulei:



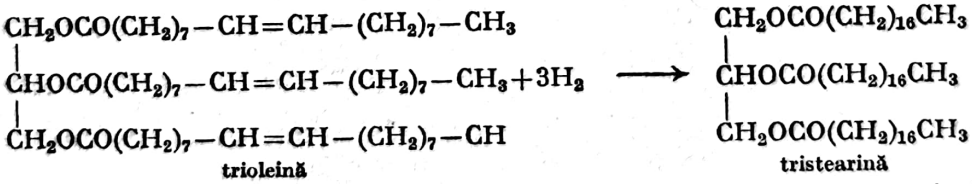
Proprietăţi chimice. Trigliceridele pot fi descompuse prin hidroliză la acizii graşi constitutivi şi la glicerol:



În laborator această reacţie necesită condiţii energice, temperaturi ridicate şi/sau catalizatori. În prezenţă de hidroxizi alcalini se obţin săpunurile alcaline ale acizilor graşi. În organismele vii, hidroliza trigliceridelor este catalizată de esteraze, denumite lipaze sau trigliceridolipaze.

Catelenele hidrocarbonate ale resturilor de acizi graşi etilenici conferă grăsimilor unele proprietăţi specifice cum sînt reacţiile de adiţie (de hidrogen, de halogen) şi de peroxidare.

Grăsimile naturale adiţionează hidrogen la dublele legături etilenice (în cataliză heterogenă) transformîndu-se în grăsimi saturate. Trioleina prin hidrogenare totală devine tristearină.



Hidrogenarea este asociată cu creşterea punctului de topire al grăsimii. Uleiurile vegetale solidificate prin hidrogenare sînt utilizate la prepararea margarinei.

Grăsimile care cuprind acizi graşi etilenici adiţionează halogeni (I_2 sau Br_2). Cantitatea de halogen în grame fixată de o anumită cantitate de grăsime (100 g) este o măsură a gradului de nesaturare a acelei grăsimi (indicele de iod). Cu cît o grăsime are un conţinut mai ridicat în acizi nesaturaţi cu atît indicele de iod are o valoare mai mare.

Grăsimile nesaturate, în special acelea care cuprind acizi polietilenici, prin expunere la lumină şi la aer suferă un proces de autooxidare în urma

Scanned with OKEN Scanner

căreia se formează peroxizi. Atacul oxidativ are loc sub acţiunea unui radical iniţiator ($\mathfrak{X}\cdot$) care atrage un atom de hidrogen de la gruparea metilenică din vecinătatea imediată a legăturii duble, sau mai uşor de la gruparea $-CH_2-$ cuprinsă între două legături etilenice (poziţie alilică):

$$-CH=CH-CH_2-CH=CH- + X\cdot \rightarrow XH + -CH=CH-\dot{C}H-CH=CH-$$

Radicalul liber se izomerizează după care fixează o moleculă de oxigen dînd naştere unui radical peroxidic:

$$-CH=CH-\dot{C}H-CH=\dot{C}H- \rightleftharpoons -CH=CH-CH=CH-\dot{C}H- \xrightarrow{+O_2}$$

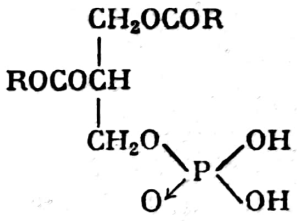
$$-CH=CH-CH=CH-\underset{\displaystyle O-O\cdot}{\overset{|}{C}}H-$$

Radicalii peroxidici atacă alte catene nesaturate întreţinînd reacţia de peroxidare în lanţ. În practică, grăsimile alimentare, în special uleiurile mai sensibile la peroxidare datorită conţinutului mai ridicat în acizi nesaturaţi, sînt conservate prin adăugarea unor cantităţi mici de substanţe care combinîndu-se cu radicalii liberi inhibă propagarea lanţurilor de reacţii radicalice (antioxidanţi). O substanţă naturală cu proprietăţi antioxidante este vitamina E.

1.3. GLICEROFOSFOLIPIDELE (FOSFATIDE)

Acestea sînt lipidele complexe cele mai răspîndite, sînt componenţi ai tuturor formaţiunilor membranare celulare.

Substanţa de bază a acestor lipide este acidul fosfatidic, compus ce rezultă prin esterificarea glicerolului cu două molecule de acid gras şi o moleculă de acid fosforic.

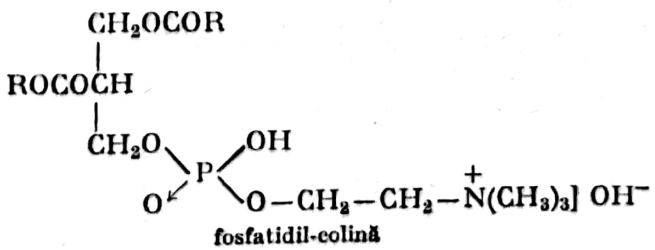


Acid fosfatidic

Acizii fosfatidici se găsesc şi ei în natură în cantităţi mici fiind intermediari ai sintezei şi degradării fosfatidelor. Fosfatidele cuprind un rest fosfatidil legat la diverşi compuşi cu funcţie alcoolică: colină, etanolamină, serină, inozitol.

1.3.1. FOSFATIDIL-COLINELE (LECITINE)

Aceste lipide cuprind un rest fosfatidil legat de colină, aminoalcoolul cu formula: $[HO-CH_2-CH_2-N^+(CH_3)_3]\ OH^-$



fosfatidil-colină

Scanned with OKEN Scanner

Cele două resturi de acid gras sînt cel mai frecvent unul saturat (la C_1) iar celălalt nesaturat (la C_2). De exemplu fosfatidil-colinele extrase din mușchii scheletici de maimuță cuprind (în procente) următorii acizi grași : acid palmitic (32,6), acid stearic (4,4), acid oleic (9,9), acid linoleic (35,4) și acizi cu mai mult de 18 atomi de carbon (16,7).

Prezența acizilor nesaturați, îndeosebi a acidului linoleic, face ca lecitinele să fie foarte sensibile la reacția de peroxidare.

În molecula unei lecitine există o funcție acidă (restul fosforil) și una bazică (baza cuaternară de amoniu) care se neutralizează reciproc, fapt ce conferă lecitinelor caracterul de ioni bipolari (sînt electric neutre):

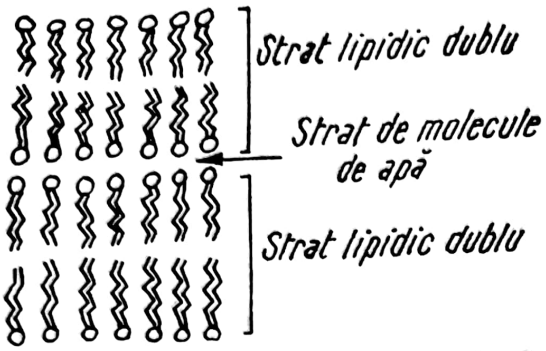
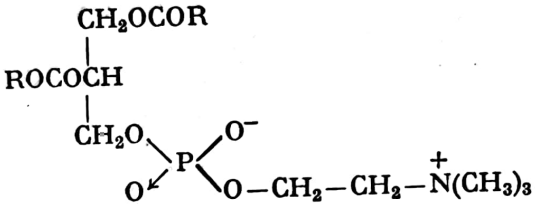


Fig. X.1. Structuri lamelare formate de lecitină în mediu apos.



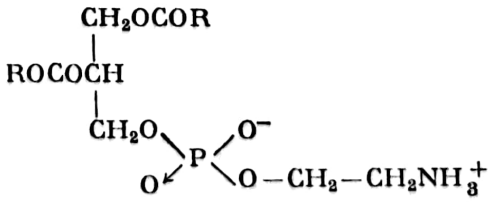
Forma bipolară a unei lecitine

Moleculele de lecitină au caracter amfipatic: catenele hidrocarbonate lungi ale resturilor de acid gras sînt hidrofobe, pe cînd regiunea moleculei cuprinzînd restul fosforil și ionul cuaternar de amoniu este puternic hidrofilă. Lecitinele în apă formează structuri lamelare în care alternează straturi duble lipidice și straturi de apă (fig. X.1). Regiunile nepolare rămîn reunite prin interacțiuni hidrofobe iar apa pătrunde printre grupările polare. Aceste structuri lamelare simple manifestă unele proprietăți ale membranelor biologice: sînt impenetrabile de către ioni, dizolvă alte substanțe nepolare. Lecitinele reprezintă categoria de lipide complexe cu răspîndirea cea mai largă, ele sînt prezente în toate membranele biologice și în cantitățile cele mai mari.

1.3.2. FOSFATIDIL-ETANOLAMINELE (CEFALINE)

Sînt fosfatide ce cuprind restul fosfatidil legat de etanolamină (colamină): $HO-CH_2-CH_2-NH_2$.

Cefalinele se află în țesuturi alături de lecitine dar în cantități mult mai mici. Sînt mai abundente în lipidele din țesutul nervos (vezi tabelul X.1). Prin proprietățile fizice, natura bipolară și caracterul amfipatic, cefalinele se aseamănă cu lecitinele.

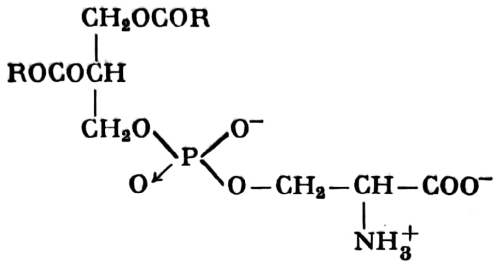


1.3.3. FOSFATIDIL-SERINELE (SERIN-CEFALINE)

Aceste fosfatide se deosebesc de cele descrise anterior prin prezența unui rest de serină legat la radicalul fosfatidil. Fosfatidil-serinele însoțesc celelalte fosfatide.

Fosfatidil-serinele poartă o sarcină netă negativă, spre deosebire de lecitine și de cefaline (cu etanolamină) care sînt neutre.

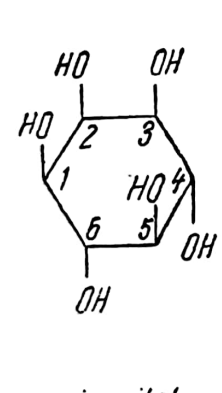
Caracterele de solubilitate ale acestor lipide sînt asemănătoare cu ale celorlalte categorii de fosfatide.



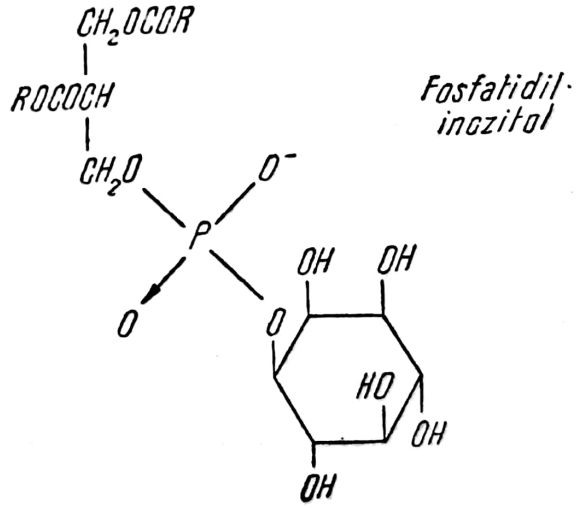
1.3.4. FOSFATIDIL-INOZITOLII (INOZITOL-FOSFATIDE, FOSFOINOZITIDE)

Acestea sînt lipide complexe care se află în cantități mici în diverse țesuturi. Substanța nervoasă albă și fibrele de mielină cuprind cantități mult mai mari de fosfatidil-inozitoli decît substanța cenușie.

Aceste lipide cuprind alcoolul ciclic mesoinozitol (sau mioinozitol). Acest compus este unul din cei nouă stereoizomeri pe care îi prezintă hexahidroxi-ciclohexanul ($C_6H_{12}O_6$):



mesoinozitol



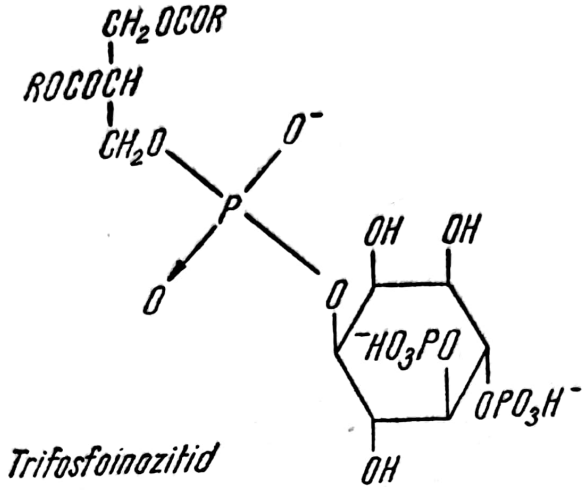
Fosfatidil-inozitol

În molecula fosfatidil-inozitolilor se află numai o funcție acidă puternică, astfel încît ele au caracter acid net și poartă o sarcină negativă. În lipidele din creier s-au identificat alte două categorii de inozitol-fosfatide care mai cuprind încă unul, sau două resturi fosforil, la grupările C_4 și C_5 din restul de inozitol (difosfo- și trifosfo-inozitide).

Aceste lipide cuprind trei resturi fosforil ionizate, poartă trei sarcini —. Ele participă la transportul cationilor prin membrane, proces fundamental pentru funcția nervoasă.

Scanned with OKEN Scanner

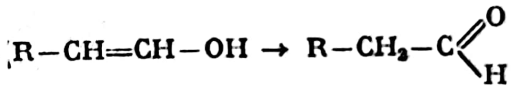
Din grupa glicerofosfolipidelor mai fac parte şi următoarele categorii de lipide:



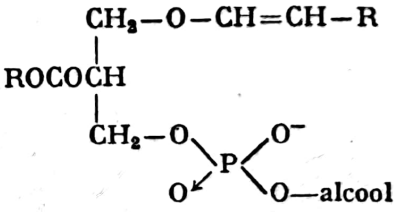
Trifosfoinozitid

1.3.5. PLASMALOGENELE (ACETAL-FOSFATIDE)

Acestea se află în toate ţesuturile dar sînt mai abundente în muşchi şi în membranele celulelor nervoase. Se deosebesc de celelalte fosfatide prin aceea că la C_1 în locul unui rest de acid gras legat esteric cuprind un enol superior. După hidroliză enolul se tautomerizează în aldehidă:

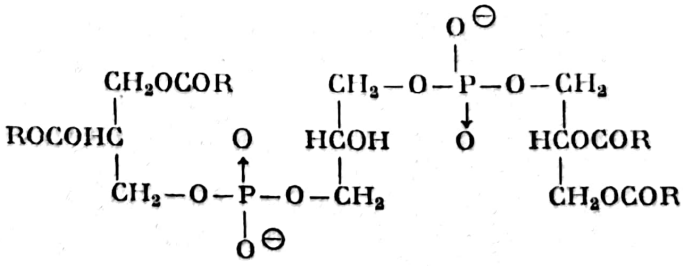


Acetal-fosfatidele cu etanolamină sînt mult mai abundente decît acelea cuprinzînd serină sau colină.



1.3.6. FOSFATIDIL-GLICEROLII

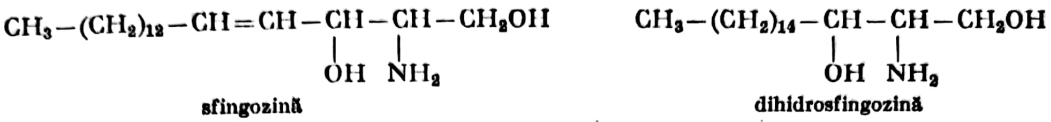
Aceste fosfolipide fără azot cuprind unul sau două resturi de acid fosfatidic legate la glicerol. Cardiolipina (difosfatidilglicerol) este una din fosfolipidele cele mai abundente din mitocondrii.



Cardiolipina

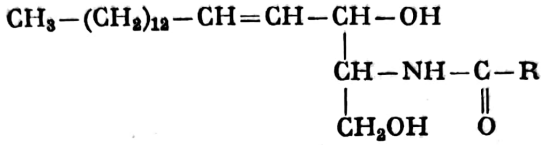
1.4. SFINGOLIPIDELE

Sfingolipidele sînt lipide care nu cuprind glicerol. Locul acestui alcool este ocupat de un amino-alcool cu 18 atomi de carbon, sfingozină (sfingol) sau derivatul ei hidrogenat, dihidrosfingozină:



sfingozină dihidrosfingozină

În sfingolipide acidul gras este *legat amidic* la gruparea $-NH_2$ a sfingozinei. Putem considera sfingolipidele ca derivaţi ai ceramidei, amida sfingozinei cu un acid gras:



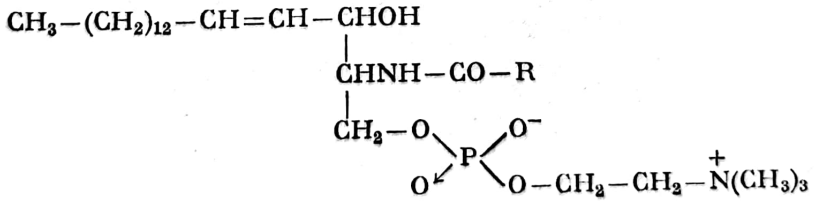
ceramidă

Acizii graşi cel mai frecvent întîlniţi în sfingolipide sînt acizi cu 24 atomi de carbon.

Sfingolipidele se subîmpart în sfingofosfolipide (sfingomieline) şi sfingolipide fără fosfor dar care cuprind o substanţă glucidică, sfingoglicolipidele. Cerebrozidele şi gangliozidele fac parte din ultima categorie.

1.4.1. SFINGOMIELINELE

Acestea sînt fosfolipide ca şi fosfatidele. Se găsesc în cantităţi mici în toate ţesuturile animale dar sînt deosebit de abundente în substanţa nervoasă albă şi nervii periferici (vezi tabelul X.1). Cuprind sfingozina legată amidic la un acid gras, în general, cu 24 atomi de carbon. Sfingomielinele din substanţa cenuşie cuprind însă într-o proproţie mare acidul stearic. Gruparea alcoolică primară este legată la fosforilcolină. Proprietăţile sfingomielinelor se aseamănă cu ale fosfatidil-colinelor: sînt ioni bipolari (deci nu au o sarcină electrică netă) şi au caracter amfipatic. Restul de acid gras şi catena hidrocarbonată a sfingozinei însumează un număr de atomi de carbon aproximativ egal cu acela al celor două resturi de acid gras din lecitine, astfel încît raportul dintre dimensiunile porţiunilor hidrofilă şi hidrofobă este acelaşi la cele două categorii de fosfolipide.

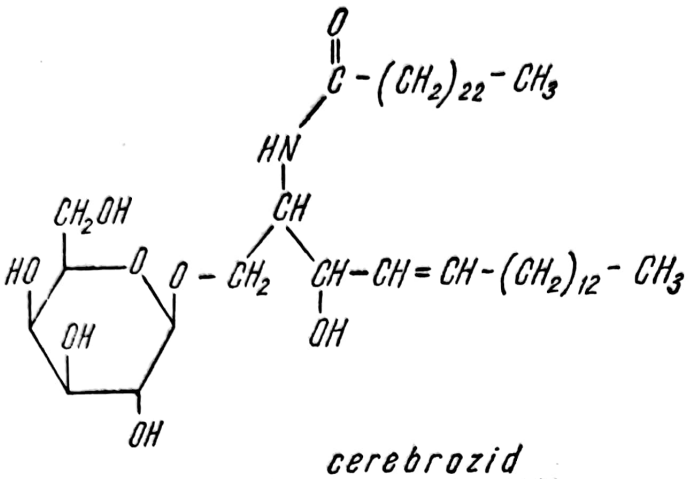


sfingomielină

1.4.2. CEREBROZIDELE

Cerebrozidele sînt lipide fără fosfor. Se află îndeosebi în lipidele din creier (substanţa albă) şi în nervi. Cuprind o ceramidă (cu un acid gras cu 24 de atomi de carbon) legată prin gruparea alcoolică primară la β-galactoză (sau la β-glucoză).

Scanned with OKEN Scanner



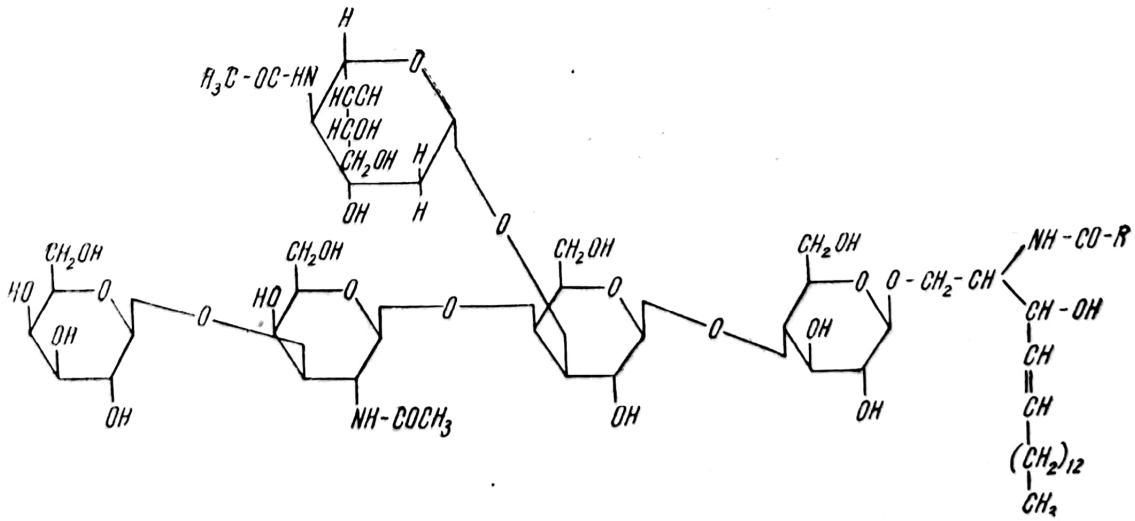
cerebrozid
(galactocerebrozid)

Cerebrozidele nu mai cuprind funcţii ionizabile şi ele nu poartă sarcini electrice. Totuşi, grupările hidroxil din restul de galactoză le conferă caracter polar, astfel că şi aceste lipide au caracter amfipatic, dar comparativ cu fosfolipidele, caracterul lipofil este mai pronunţat.

Din cerebrozide, prin esterificarea unor grupări alcoolice ale restului galactozil cu acid sulfuric se formează sulfatidele — lipide răspîndite în substanţa nervoasă. Într-o maladie nervoasă — leucodistrofie metacromatică — conţinutul în sulfatide al lipidelor din creier creşte de 2—5 ori.

1.4.3. GANGLIOZIDELE

Acestea sînt glicolipide dar, spre deosebire de cerebrozide, au drept componentă glucidică un oligozaharid. Au fost identificate mai întîi în lipidele din creier unde sînt mai abundente dar se află în toate ţesuturile. Substanţa nervoasă cenuşie este ţesutul cel mai bogat în gangliozide. Gangliozdele cuprind o ceramidă în care acidul gras predominant este acidul stearic (şi nu un acid cu C_{24} ca în cerebrozite). Partea glucdică este constituită dintr-un oligozaharid, galactozil-N-acetil-galactozaminil-galactozil-glucozil, legat la rîndul lui de unul, două sau trei resturi de acid sialic (monosialo-, disialo- şi trisialo-gangliozid). Formula monosialo-gangliozidului este următoarea:



Concentraţia gangliozidelor în creier se modifică foarte mult în perioadele timpurii ale dezvoltării. Conţinutul în gangliozide al creierului de şobolan creşte de 50 de ori de la naştere pînă la a 5-a săptămînă. La om s-a observat o creştere netă a conţinutului în gangliozide pînă la vîrsta de 30 de ani (tabelul X.1).

Tabelul X.1

Comparaţie între compoziţia în lipide a ficatului şi a substanţei nervoase la om*

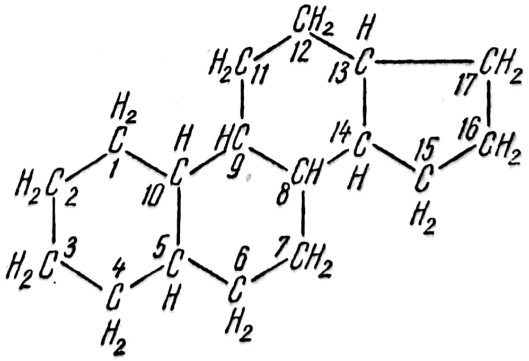
Constituent	Ficat	Creier fetal (5 luni)	Creier adult (substanţa cenuşie)	Creier adult (substanţa albă)	Nervi periferici
Apă	75	90	82,3	75,2	44,3
Lipide totale	24	21	39,6	64,6	65,8
Colesterol	2,9	4,3	7,2	15,1	14,5
Colesteril-esteri	2,3	0	0	0	0
Trigliceride	11,5	0	0,2	0,4	4,4
Cerebrozide	—	0,016	2,3	12,5	8,3
Sulfatide	—	0,01	0,8	3,0	1,4
Fosfolipide cu etanolamină (cefaline şi plasmolagene)	—	6,2	9,2	9,1	10,3
Fosfatidil-serine	7,2	—	2,9	4,2	5,4
Fosfatidil-coline	—	8,2	9,0	8,2	8,4
Sfingomieline	—	0,45	1,9	5,2	8,9
Gangliozide	—	0,9	1,9	0,38	—

*Cu excepţia apei, valorile reprezintă procente din greutatea uscată.

1.5. COMPUŞII STEROIDICI

Compuşii steroidici sau steroizii alcătuiesc o clasă de substanţe naturale care posedă caracterele de solubilitate proprii lipidelor. Steroizii cu funcţii hidroxil se află şi sub formă de esteri cu acizii graşi (lipide simple). Hormonii sexuali, hormonii corticosuprarenali, acizii biliari şi sterolii (colesterolul) sînt compuşii steroidici importanţi din regnul animal.

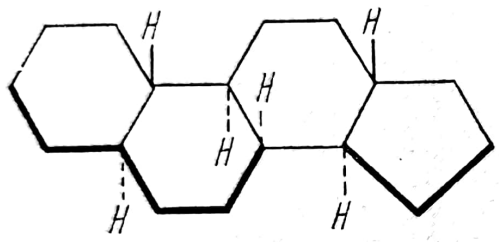
Steroizii sînt derivaţi ai unui compus tetraciclic, căruia i s-a dat denumirea de steran:



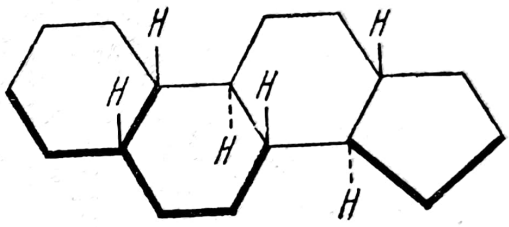
Acest compus poate exista sub formă a numeroşi (64) stereoizomeri după orientarea atomilor de hidrogen fixaţi la atomii de carbon de la joncţiunea ciclurilor (C_5, C_{10}, C_9, C_8, C_{13} şi C_{14}).

Scanned with OKEN Scanner

Pentru a se putea preciza relaţiile stereochimice dintre substituenţi au fost introduse unele convenţii privind scrierea formulelor compuşilor steroidici. Astfel, cu toate că atomii de carbon nu sînt coplanari, ciclurile hexagonale au conformaţie scaun, se defineşte o faţă superioară (sau dacă nucleul este imaginat perpendicular pe planul hîrtiei, o faţă anterioară) şi una inferioară (sau posterioară) a nucleului tetraciclic. Legăturile dirijate spre partea anterioară (superioară a ciclului) sînt redate prin linii pline (—) şi sînt denumite legături β. Substituenţii care se află pe partea opusă (posterioară) sînt legaţi la nucleu prin legături α care sînt redate prin linii punctate ---. Atomii de carbon situaţi la joncţiunea ciclurilor poartă un singur substituent care poate avea cele două orientări α sau β, ceea ce creează posibilitatea existenţei a 64 de sterani stereoizomeri. Totuşi, în natură nu se întîlnesc decît derivaţi de la doi dintre aceştia, respectiv, stereoizomerii care diferă prin modul de legare a atomului de hidrogen de la C_5. Acestor doi compuşi fundamentali li s-a atribuit denumirea de gonan, 5α- şi 5β-gonan. Configuraţiile celorlalte 5 centre de izomerie (C_8, C_4, C_{10}, C_{14}, C_{13}) sînt aceleaşi la toţi steroizii naturali.



5α - gonan



5β - gonan

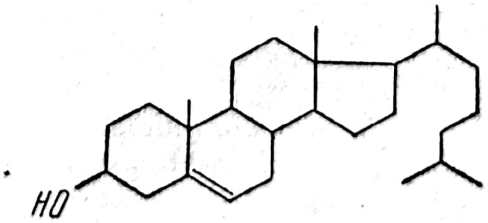
Prin substituirea unui atom de hidrogen din grupările $-CH_2-$ ale gonanului cu o grupare funcţională sau un radical oarecare, există posibilitatea ca gruparea substituentă să fie legată α sau β. Este deci necesar să se precizeze şi în aceste cazuri orientarea substituentului faţă de planul general al moleculei.

Steroizii care îndeplinesc un acelaşi gen de acţiuni biologice au structuri înrudite, cuprind acelaşi număr de atomi de carbon, astfel că diversele grupuri de steroizi sînt considerate ca derivînd de la o anumită hidrocarbură fundamentală (tabelul X.2).

1.5.1. STEROLII

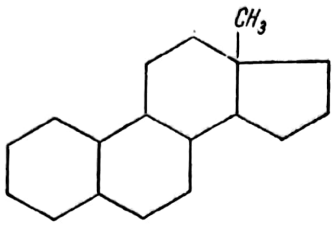
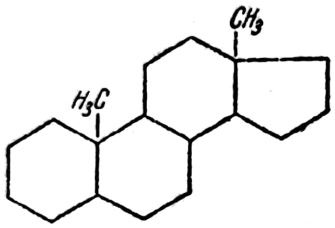
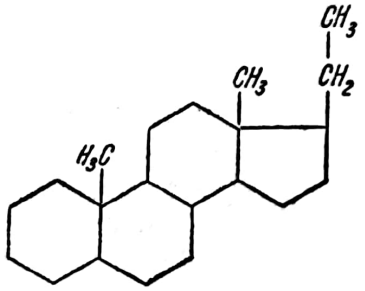
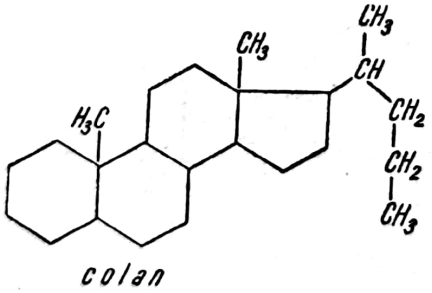
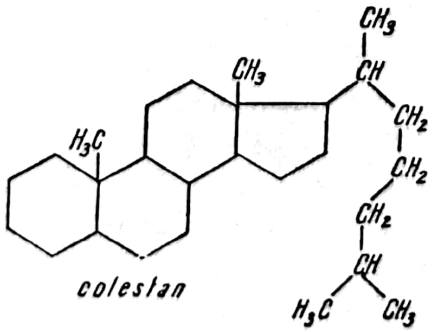
Sînt alcooli steroidici foarte răspîndiţi în natură. Colesterolul face parte din această familie şi este un compus specific animalelor superioare fiind absent la plante şi la nevertebrate. Se găseşte în toate ţesuturile şi în cantitate relativ mare în bilă (6 g/l). Pietrele din vezica biliară sînt constituite din colesterol aproape pur.

Este un steroid cu C_{27}, derivat din colestan cu formula:



Tabelul X.2

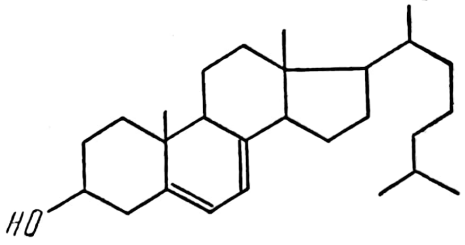
Compușii fundamentali din care derivă principalele categorii de steroizi naturali

Numărul de atomi de carbon	Hidrocarbura fundamentală	Compușii naturali
C_{18}	 *estran*	Hormonii estrogeni
C_{19}	 *androstan*	Hormonii androgeni
C_{21}	 *pregnan*	Hormonii corticosteroizi și progestinele
C_{24}	 *colan*	Acizii biliari
C_{27}	 *colestan*	Colesterolul și alți steroli animali

Cuprinde o legătură dublă la C_5 și o grupare alcoolică la C_3 fixată la nucleu printr-o legătură β. În organism se află atît liber cît și esterificat cu acizi grași.

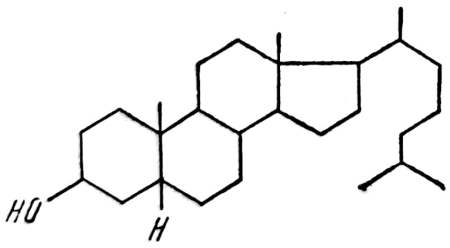
Colesterolul este o substanță solidă, albă, insolubilă în apă. Nucleul hidrocarbonat tetraciclic împreună cu catena laterală ($-C_8H_{17}$) conferă moleculei un caracter hidrofob pronunțat, astfel încît unica grupare polară ($-OH$) nu permite o interacțiune puternică cu moleculele de apă. Esterii colesterolului sînt substanțe perfect hidrofobe.

Colesterolul este precursorul celorlalți compuși steroidici din organism avînd totodată roluri importante în construcția membranelor celulare, împreună cu fosfolipidele și cu proteinele. Molecula plată, hidrofobă a colesterolului joacă un rol esențial în asamblarea lipidelor polare (fosfolipide) cu proteinele pentru a forma lipoproteine. Din colesterol se formează în organism alți steroli: 7-dehidrocolesterolul, colestanolul și coprostanolul. Primul compus se formează prin dehidrogenare și este precursorul unei vitamine D (vitamina D_3 sau colecalciferol):

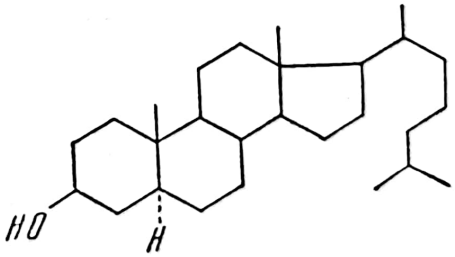


7-dehidrocolesterolul

Coprostanolul și colestanolul se formează în intestin prin acțiunea florei microbiene asupra colesterolului excretat prin bilă sau prin mucoasa intestinală.



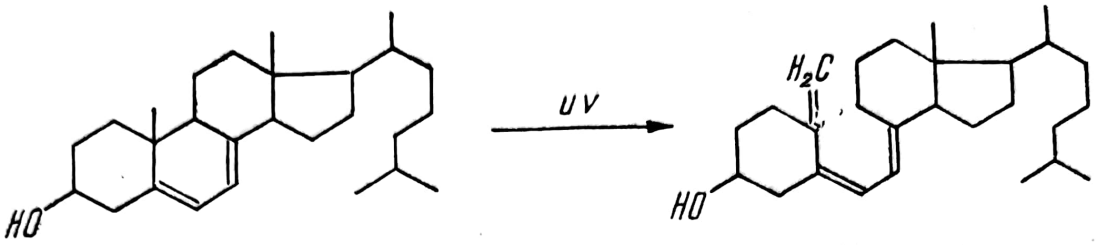
coprostanol



colestanol

Vitaminele D (*calciferolii*). Nu sînt compuși steroidici propriu-ziși, dar sînt înrudiți genetic cu aceștia. Vitaminele D provin din anumiți steroli cărora li se spune provitamine D. 7-dehidrocolesterolul este provitamina colecalciferolului (vitamina D_3). Vitamina D_2 (ergocalciferolul) provine dintr-un sterol răspîndit la drojdii și ciuperci, ergosterol. Vitamina D_2 și provitamina sa (ergosterolul) diferă de compușii D_3 prin catena laterală. Transformarea provitaminei D în vitamină implică deschiderea ciclului B al nucleului steranic și migrarea unui atom de hidrogen. Reacția are loc în

prezenţa radiaţiilor cu lungimi de undă mici (din domeniul violet şi ultraviolet):

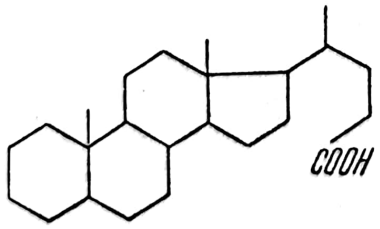


7 - dehidrocolesterol *vitamina D_3*

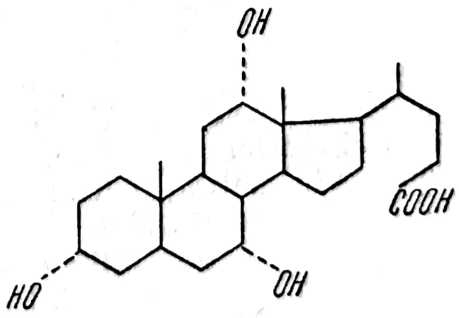
Vitaminele D ca şi provitaminele corespunzătoare sînt insolubile în apă, ele se dizolvă uşor în alte lipide (vitamine liposolubile). Forma biologic activă a vitaminelor D este derivatul lor dihidroxilat 1,25-dihidroxicalciferol. Hidroxilarea în poziţia 25 are loc în ficat, iar cea din poziţia 1 în rinichi. Ţinîndu-se seama că vitamina D_3 şi forma sa activă pot fi sintetizate integral în organism pornindu-se de la precursori simpli (acetil-CoA) se poate spune că aceşti compuşi sînt mai degrabă hormoni decît vitamine.

1.5.2. ACIZII BILIARI

Acizii biliari sînt componenţi principali ai bilei. Ei joacă roluri importante la solubilizarea şi absorbţia interstinală a lipidelor. Sînt compuşi endogeni sintetizaţi din colesterol şi din acest punct de vedere sinteza şi eliminarea de acizi biliari reprezintă o cale de excreţie a colesterolului. Sînt steroizi cu C_{24} derivaţi ai colanului. Compusul cu o grupare —COOH la C_{24} este acidul colanic şi acizii biliari sînt derivaţi hidroxilaţi ai acestuia în una sau mai multe din poziţiile 3, 7 şi 12. Acidul biliar cel mai important din bila omului este acidul colic (acid 3,7,12-trihidroxicolanic). Grupările hidroxil sînt toate fixate prin legături α, sînt situate în raport cu grupările $-CH_3$ pe partea opusă a nucleului tetraciclic. Alţi acizi biliari sînt acidul litocolic (3-hidroxicolanic) şi acidul chenodezoxicolic (3,7-dihidroxicolanic), acidul dezoxicolic (3,12-dihidroxicolanic).



Acid colanic



Acid colic

Acidul colic şi ceilalţi acizi biliari se află în bilă în cea mai mare parte sub formă de amide cu glicocolul sau cu taurina ($H_2N-CH_2-CH_2-SO_3H$), un derivat al cisteinei. Conjugaţii acidului colic sînt acidul glicocolic (colil-NH—CH_2—COOH) şi respectiv, acidul taurocolic (colil-NH—CH_2—

CH_2-SO_3H). Aceşti compuşi se află în pH-urile fiziologice ca săruri (săruri biliare).

Acizii biliari liberi sau conjugaţi au proprietăţi unice de solubilitate. Cuprind grupări polare, hidroxilice şi $-COO^-$ (sau $-SO_3^-$) iar nucleul hidrocarbonat steranic conferă acizilor biliari însuşiri hidrofobe. Regiunile hidrofilă şi hidrofobă ale moleculei nu sînt net separate ca la alte lipide amfipatice (fosfolipide, săpunuri); la acizii biliari ele reprezintă cele două feţe ale nucleului rigid al steranului. Acizii biliari interacţionează cu apa şi cu alte lipide într-un mod particular. Singuri se dizolvă în apă formînd soluţii micelare prin agregarea unui număr relativ mic de molecule. Acizii biliari au proprietatea remarcabilă de a forma foarte uşor agregate micelare mixte împreună cu alte categorii de lipide. Miceliile — săruri biliare-lecitine au forma unor mici bastonaşe. Moleculele de lecitină formează un cilindru bimolecular care la capete expune grupările polare (restul fosforil şi ionul cuaternar de amoniu). Sărurile biliare interacţionează prin forţa van der Waals cu regiunile hidrofobe ale moleculelor de lecitină învelind particula cu un strat de acizi biliari. Această structură permite ca grupările hidrofobe să fie ascunse în interior iar exteriorul particulei să fie presărat cu grupările hidrofile ale sării biliare şi ale moleculelor de fosfolipide (fig. X.2).

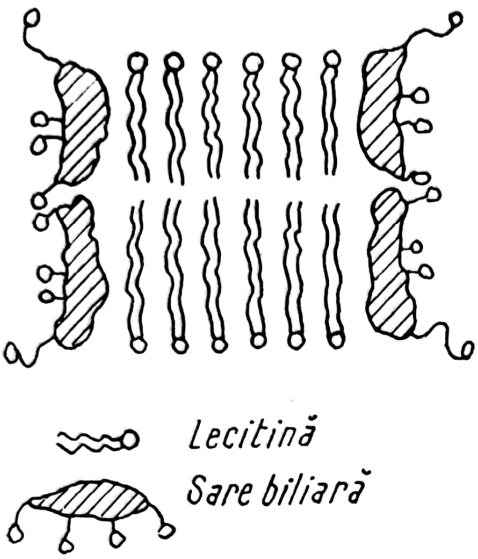


Fig. X.2. Structura unei micelii mixte sare biliară — lecitină (secţiune longitudinală).

Miceliile mixte săruri biliare-lecitine au o capacitate foarte mare de a solubiliza alte categorii de lipide polare (monogliceride, acizi graşi) sau mai puţin polare (colesterol, esteri ai colesterolului, trigliceride). Moleculele nepolare sînt încoporate în centrul hidrofob al moleculei iar lipidele amfipatice se intercalează printre moleculele de fosfolipide.

1.6. CAROTENOIZII

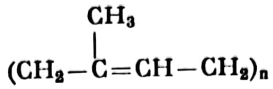
Aceşti compuşi sînt hidrocarburi superioare polinesaturate şi derivaţi oxigenaţi ai acestora (alcooli, aldehide, acizi). Sînt prezenţi în toate organismele vii dar în cantităţi mici. Sînt sintetizaţi numai de plante şi carotenoizii din ţesuturile animale, sînt de origine exogenă. Sînt substanţe colorate în roşu-portocaliu, în ţesuturile animale fiind dizolvate în grăsimi pe care le colorează în galben (lipocromi). La plante carotenoizii joacă roluri importante în reacţiile fotochimice. Pentru biochimia animală carotenoizii prezintă interes fiind precursorii vitaminei A.

Carotenoizii fac parte din clasa compuşilor naturali cu schelet izoprenic la care unitatea repetitivă este un rest din hidrocarbura izopren:

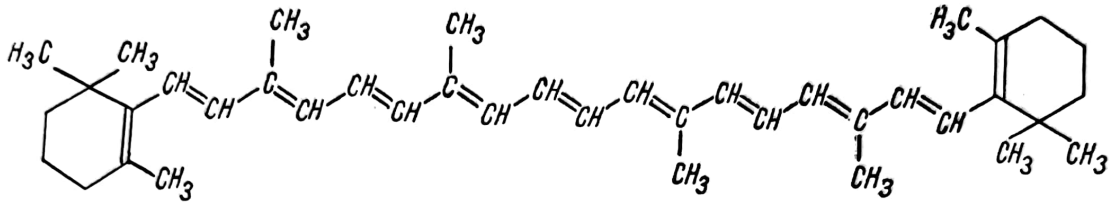
$$CH_2=\underset{\displaystyle CH_3}{\overset{|}{C}}-CH=CH_2$$

Scanned with OKEN Scanner

Un poliizopren tipic, cum este cauciucul, are scheletul:

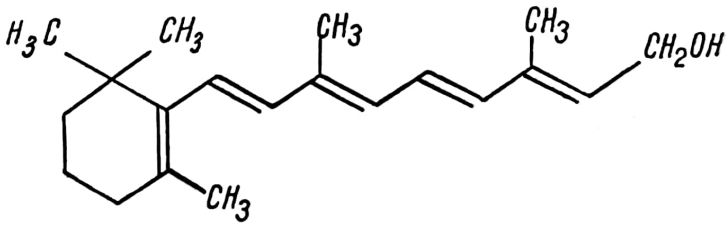


Alţi compuşi izoprenici naturali au un grad de nesaturare mai mic sau mai mare decît al poliizoprenului. Unul dintre carotenoizii cei mai importanţi este β-carotenul. Este o hidrocarbură nesaturată ($C_{40}H_{56}$), cuprinzînd 8 unităţi izoprenice şi un sistem de 11 legături duble conjugate, cu configuraţie trans:



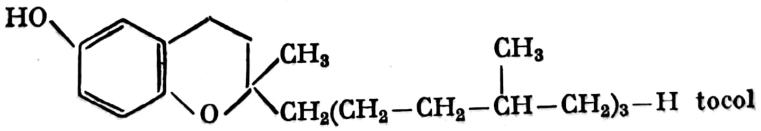
β- caroten

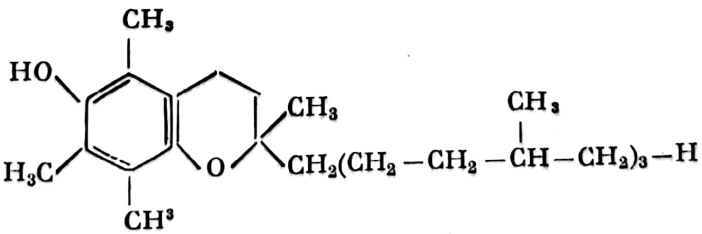
β-carotenul, datorită sistemului polienic conjugat este colorat în roşu-violet. Este provitamina A, în ficat suferă o scindare oxidativă în mijlocul moleculei dînd naştere, în principiu, la două molecule de vitamină A (retinol):



Vitaminele E şi K. Aceste vitamine liposolubile cuprind catene hidrocarbonate lungi cu schelet izoprenic legate pe nuclee aromatice sau heterociclice.

Vitamina E sau tocoferolul există sub forma mai multor compuşi înrudiţi care diferă prin numărul şi poziţia grupărilor metil fixate pe o substanţă de bază denumitătocol. Substanţa cu cea mai ridicată activitate biologică este α-tocoferolul (5,7,8-trimetil-tocol):

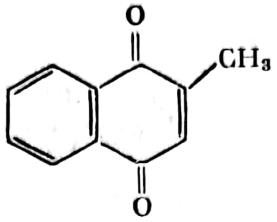




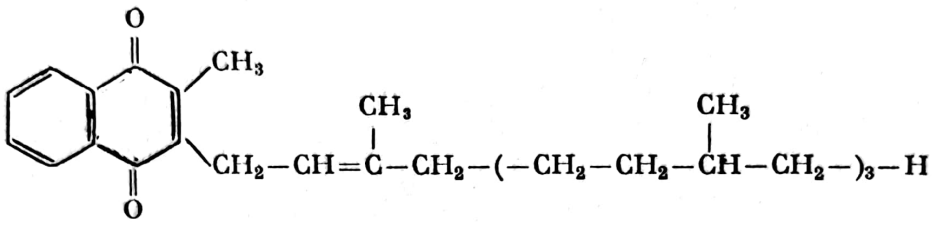
α-tocoferol

Vitamina K (filochinona) există sub forma a doi compuşi naturali, vitamina K_1 şi K_2. Vitamina K_3 sau menadiona este un compus sintetic, biologic

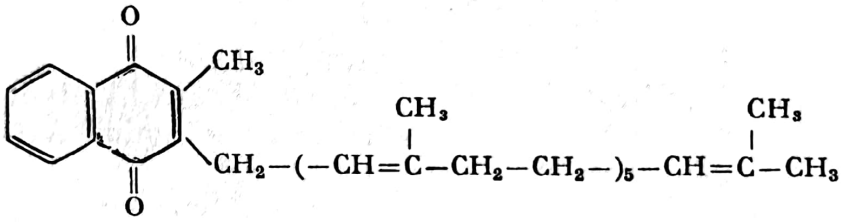
activ, care diferă de vitaminele naturale prin absența catenei izoprenice legată la nucleul metilat al naftochinonei:



Vitamina K_3 sau menadiona



Vitamina K_1



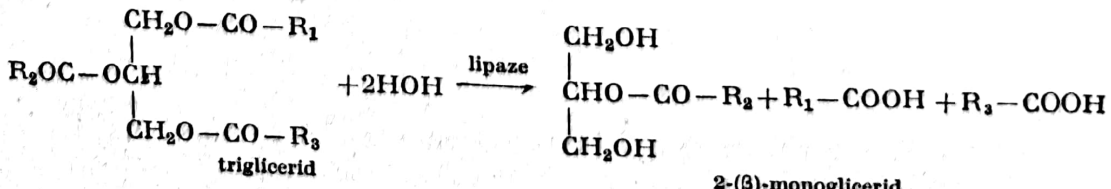
Vitamina K_2

2. DIGESTIA ȘI ABSORBȚIA LIPIDELOR

Principalele componente lipidice ale rației alimentare sînt trigliceridele (grăsimile neutre) după care urmează fosfolipidele (lecitine, cefaline, sfingomieline), colesterolul liber și esterificat, carotenii și vitaminele liposolubile (A, D, E și K). Digestia și absorbția lipidelor este un proces complex întrucît pe lîngă necesitatea degradării lor hidrolitice se mai adaugă problema solubilizării și menținerii într-un mediu apos a unor substanțe hidrofobe. Acizii biliari (simpli sau conjugați) deversați cu bila în duoden împreună cu unele lipide alimentare au un rol esențial în solubilizarea lipidelor și încorporarea lor într-o formă ușor absorbabilă prin peretele intestinal.

Lipidele alimentare cînd vin în contact cu bila care cuprinde cantități importante de acizi biliari și de lecitine (fosfatidil-coline) sînt dispersate sub forma unei soluții coloidale (emulsie) cu un grad de dispersie mijlociu (diametrul picăturilor de grăsime fiind cuprins între 0,5 și 1 μ). Asupra lipidelor emulsionate acționează hidrolaze pancreatice relativ specifice: lipazele asupra trigliceridelor, fosfolipazele asupra fosfatidelor, colesterol esteraza asupra esterilor colesterolului.

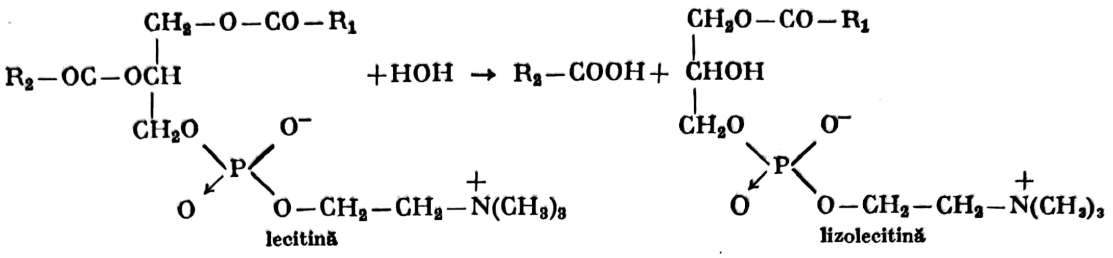
Lipazele au specificitate pentru legătura esterică din pozițiile α și α' (1 și 3) ale unui triglicerid:



triglicerid

2-(β)-monoglicerid

Asupra fosfatidelor (a lecitinelor) acționează fosfolipaze, esteraze cu specificitate pentru legătura carboxil esterică din poziția 2, care transformă lecitinele în lizolecitine:



lecitină lizolecitină

Prin scăderea raportului dintre mărimea regiunii hidrofilă și hidrofobă, ca urmare a detașării unui radical hidrocarbonat lung, lizolecitinele au proprietăți detergente foarte puternice participînd alături de ceilalți factori la solubilizarea lipidelor în intestin.

Colesterolul și esterii săi prezenți în lumenul intestinal provin din trei surse: din alimente, din bilă și din descuamațiile mucoasei intestinale. Esterii colesterolului sînt hidrolizați în totalitate sub acțiunea colesterol esterazei pancreatice.

Lipidele alimentare nehidrolizate și produșii de hidroliză insolubili în apă sau parțial solubili, împreună cu acizii biliari, formează o fază solubilă în apă constituită din micelii mixte în care acizii biliari, datorită structurii lor particulare, au un rol stabilizator esențial. Aceste agregate micelare cu diametre de aproximativ 5 nm pătrund în spațiile intervilozitare și moleculele lipidice străbat membrana enterocitelor. Acizii biliari nu sînt absorbiți la acest nivel al intestinului, ei se reîntorc în lumen participînd la solubilizarea și transportul altor molecule lipidice. Digestia și absorbția lipidelor are loc în regiunea proximală a jejunului. Acizii biliari cînd ajung în porțiunea distală a ileonului sînt absorbiți printr-un mecanism activ care asigură o extracție eficientă. Prin sistemul port acizii biliari ajung la ficat și din nou în bilă și intestin, realizîndu-se în acest fel circuitul lor entero-hepatic.

În interiorul enterocitelor are loc o activitate sintetică importantă în urma căreia se reconstituie trigliceridele, fosfolipidele, esterii colesterolului. Căile de sinteză ale acestor compuși sînt tratate mai departe. Aceste lipide, unele cu polarități mai mari, altele hidrofobe, împreună cu cantități mici de proteină, formează particule lipoproteice denumite chilomicroni și lipoproteine cu densitate foarte mică. Chilomicronii, forma majoră de transport a lipidelor alimentare, conțin aproximativ 2% proteine, 86% trigliceride, 8,5% fosfolipide și 3% colesterol liber + esteri ai colesterolului. Lipoproteinele cu densitate foarte mică comparativ cu chilomicronii au un conținut mai ridicat în proteine (7%) și mai scăzut în lipide (93%). Proteinele necesare formării acestor lipoproteine sînt sintetizate în enterocite sau sînt de origine hepatică. Chilomicronii de la nivelul intestinului, prin vasele limfatice și canalul toracic, ajung în circulația sistemică fiind distribuiți diverselor țesuturi și organe. O cantitate mică din produșii digestiei intestinale a lipidelor pătrund în organism prin sistemul portal hepatic. Este vorba de acizii grași inferiori, acid butiric (C_4), acid caproic (C_6) și alții care se află în grăsimile din laptele de vacă.

Scanned with OKEN Scanner

3. TRANSFORMĂRILE METABOLICE ALE LIPIDELOR

Lipidele, în special trigliceridele, componentele lipidice majore ale organismului şi ale raţiilor alimentare, sînt molecule energogene şi metabolismul lor este întru totul subordonat acestei funcţii. De fapt acizii graşi, care reprezintă aproximativ 90% din greutatea unui triglicerid, cuprinzînd catene hidrocarbonate lungi sînt răspunzători de capacitatea trigliceridelor de a înmagazina şi de a pune în libertate prin ardere energie metabolică. Celelalte categorii de lipide — fosfatidele, sfingolipidele, colesterolul — pe lîngă unele roluri structurale strict specifice, joacă roluri importante auxiliare, în transportul trigliceridelor endogene şi exogene în cuprinsul organismului.

În acest subcapitol sînt prezentate căile de degradare şi de biosinteză a acizilor graşi, a trigliceridelor, a fosfatidelor urmînd ca în următorul subcapitol să fie examinate particularităţile tisulare ale metabolismului lipidic şi transportul plasmatic al lipidelor.

3.1. METABOLISMUL ACIZILOR GRAŞI

3.1.1. CATABOLISMUL ACIZILOR GRAŞI

Prin arderea acizilor graşi se metabolizează cantităţi mai mari de energie decît acelea puse în libertate de oxidarea glucidelor, deoarece catenele hidrocarbonate din moleculele de acizi graşi cuprind mai mult hidrogen decît glucoza. Rolul biologic fundamental al acizilor graşi şi al trigliceridelor care îi eliberează prin hidroliză este furnizarea de energie metabolică prin ardere la bioxid de carbon şi apă. Acizii graşi sînt substratul energetic preferat al multor ţesuturi; fac excepţie creierul şi eritrocitele.

Arderea unei molecule de acid palmitic (acidul gras cel mai abundent al ţesuturilor animale) are un efect energetic considerabil:

$$CH_3-(CH_2)_{14}-COOH+23\,O_2 \rightarrow 16\,CO_2+16\,H_2O$$

$$\Delta G^{\circ\prime}=-2\,340 \quad \text{Kcal}$$

$\Delta G^{\circ\prime}$ întrece cu mult energia mobilizată la oxidarea glucozei ($\Delta G^{\circ\prime}=-686$ Kcal). Dacă raportăm valorile ΔG la cîte 100 g substanţă reiese diferenţa netă dintre efectul energetic al arderii acizilor graşi şi al arderii glucozei:

glucoză: $\Delta G=-347$ Kcal/100 g

acid palmitic: $\Delta G=-914$ Kcal/100 g

Arderea acizilor graşi este cuplată energetic cu sinteză de ATP, proces ce se desfăşoară cu un randament ridicat (40%), subliniindu-se în acest fel rolul metabolic al procesului.

Degradarea oxidativă completă a unui acid gras pînă la CO_2 şi H_2O desfăşoară în trei etape (fig. X.3). Prima etapă (β-oxidare) este specifică catabolismului acizilor graşi, pe cînd celelalte, ciclul acizilor tricarboxilici lanţul respirator sînt căi oxidative terminale comune şi pentru celalte tipuri de substrate energetice (glucoză, aminoacizi).

Scanned with OKEN Scanner

În prima etapă, denumită β-oxidare, molecula de acid gras suferă un atac oxidativ la atomul de carbon din poziţia β (Cβ) care este urmat de desprinderea unui fragment cu doi atomi de carbon sub formă de acetil-CoA. Prin repetarea de mai multe ori (de 7 ori în cazul acidului palmitic) a secvenţei de β-oxidare, acidul gras este transformat în $\frac{n}{2}$ molecule de acetil-CoA (n este

I β-oxidare	$\begin{cases} CH_3-(CH_2)_{14}-COOH+8CoASH+6H_2O \rightarrow \\ 8CH_3-CO\sim SCoA+28\,[H] \end{cases}$
II Ciclul acizilor tricarboxilici	$\begin{cases} 8CH_3-CO\sim SCoA+24\,H_2O \rightarrow \\ 16\,CO_2+8\,CoASH+64\,[H] \end{cases}$
III Lanţul respirator	$-\ \{92\,[H]+23\,O_2 \rightarrow 46\,H_2O$
SUMA:	$-\ CH_3-(CH_2)_{14}-COOH+23\,O_2 \rightarrow 16\,CO_2+16\,H_2O$

Fig. X.3. Schema degradării oxidative complete a acidului palmitic.

numărul de atomi de carbon, totdeauna un număr par). În această etapă este labilizată o fracţiune importantă din atomii de hidrogen ai acidului gras. Etapa a doua corespunde degradării oxidative a resturilor acetil în ciclul acizilor tricarboxilici, etapă în care atomii de carbon sînt oxidaţi la CO_2 iar restul atomilor de hidrogen sînt labilizaţi prin dehidrogenări şi fixaţi pe coenzime. Procesul este completat prin oxidarea hidrogenului fixat pe coenzime în lanţul respirator (etapa a III-a). Oxidarea acidului palmitic are loc cu sinteza cuplată a 131 molecule de ATP şi dintre acestea 123 se obţin prin fosforilări cuplate cu lanţul respirator şi numai 8 molecule prin fosforilări cuplate cu oxidările din ciclul acizilor tricarboxilici. β-Oxidarea ca şi ciclul acizilor tricarboxilici şi lanţul respirator sînt procese mitocondriale, ele sînt asociate atît funcţional cît şi structural, prin localizarea sistemelor lor enzimatice.

β-Oxidarea acizilor graşi (ciclul sau spirala lui Lynen). Atacul oxidativ al acizilor graşi începe după activarea lor sub formă de tiolesteri ai coenzimei A. Reacţia de activare este cuplată energetic cu scindarea ATP-ului la AMP şi pirofosfat:

$$CH_3-(CH_2)_{14}-COOH+ATP+CoASH \rightarrow \underset{\text{acil-CoA}}{CH_3-(CH_2)_{14}-CO\sim S\text{-}CoA}+AMP+PP_i$$

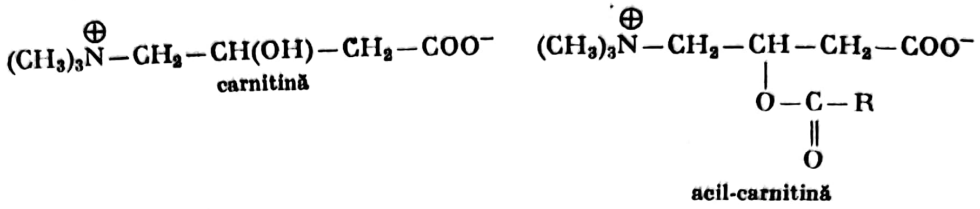
Enzimele care catalizează reacţia sînt denumite tiokinaze. Se cunosc mai multe tiokinaze specifice pentru acizi graşi inferiori, medii şi superiori. O reacţie auxiliară de activare utilizează ca donator de energie în locul ATP-ului, un alt nucleozido-trifosfat, GTP. În acest caz GTP-ul suferă o scindare în GDP şi P_i.

Derivaţii acil-CoA sînt compuşi cu un potenţial energetic ridicat, ei cuprind o legătură macroergică cu un $\Delta G^{\circ\prime}$ de cca 7—8 Kcal. Activarea acizilor graşi necesită atît o sursă de energie — ATP sau GTP — cît şi coenzima A liberă, fiind dependentă de concentraţia intracelulară a coenzimei A.

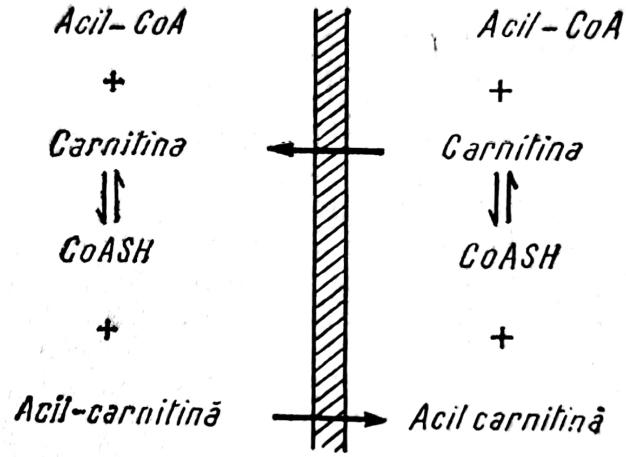
Derivaţii acil-CoA sînt separaţi printr-o barieră nepenetrabilă, membrana internă a mitocondriilor, de enzimele β-oxidării. Dispoziţia suscitată necesită funcţionarea unui mecanism de transport al derivaţilor acil-CoA peste această barieră. Compusul care îndeplineşte rolul de cărăuş pentru grupurile acil este carnitina, ce formează cu acizii graşi, esteri, acil-carnitină.

Scanned with OKEN Scanner

care datorită grupărilor încărcate⁻ — ionul carboxilat şi ionul cuaternar de amoniu — au o hidrofilie crescută şi sînt penetrabili prin membranele mitocondriale lipoproteice.



Pentru a transporta un derivat acil-CoA dintr-un compartiment în celălalt au loc două reacţii de transacilare:



β-Oxidarea unui derivat acil-CoA cuprinde o secvenţă de patru reacţii în care prin două dehidrogenări separate de o reacţie de hidratare, Cβ al acidului gras este oxidat la stadiul de carbonil. Urmează apoi scindarea legăturii Cα—Cβ prin elementele unei molecule de coenzimă A (tioliză) rezultînd o moleculă de acetil-CoA şi un derivat acil-CoA cu doi atomi de carbon mai puţin. În fig. X.4 sînt arătate cele patru reacţii ale ciclului de β-oxidare a unui derivat acil-CoA. Enzimele β-oxidării acţionează concertat, produsul unei reacţii este consumat în reacţia subsecventă, astfel încît intermediarii β-oxidării, enoil-, β-hidroxiacil- şi β-cetoacil-CoA nu se acumulează. Ecuaţia globală a unui ciclu β-oxidativ este:

$$CH_3-(CH_2)_n-CH_2-CH_2-CO-SCoA+HOH+FAD+NAD^+ + CoASH \rightarrow$$
$$CH_3-(CH_2)_{n-2}-CO-SCoA+CH_3-CO-SCoA+FADH_2+NADH+H^+$$

Palmitil-CoA este degradat în totalitate la acetil-CoA prin repetarea ciclului β-oxidativ de 7 ori:

$$\text{Palmitil-CoA}+7\ CoASH+7\ NAD^+ +7\ FAD+7\ H_2O \rightarrow$$
$$8\ \text{acetil-CoA}+7\ FADH_2+7\ NADH+7\ H^+$$

β-Oxidarea acizilor graşi constă prin urmare în repetarea periodică a unor reacţii de acelaşi tip şi este cunoscută ca spirala de oxidare a acizilor graşi sau spirala lui Lynen (fig. X.5).

Scanned with OKEN Scanner

Etapele terminale ale degradării oxidative a acizilor graşi includ ciclul acizilor tricarboxilici care oxidează atomii de carbon din resturile acetil la bioxid de carbon şi labilizează opt atomi de hidrogen pentru fiecare rest acetil şi lanţul respirator unde atomii de hidrogen sînt combinaţi cu oxigenul. Dacă

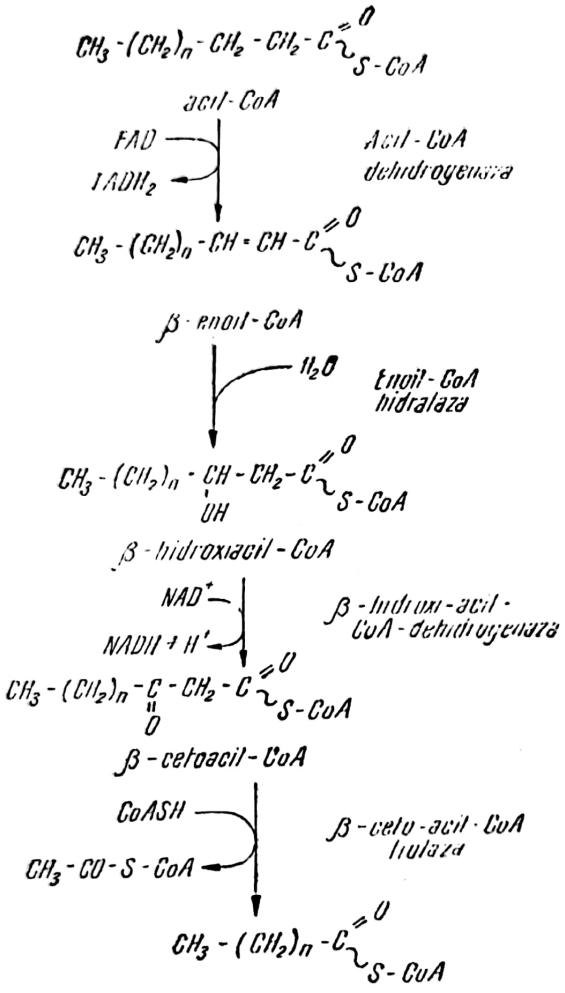


Fig. X.4. β-Oxidarea acizilor graşi.

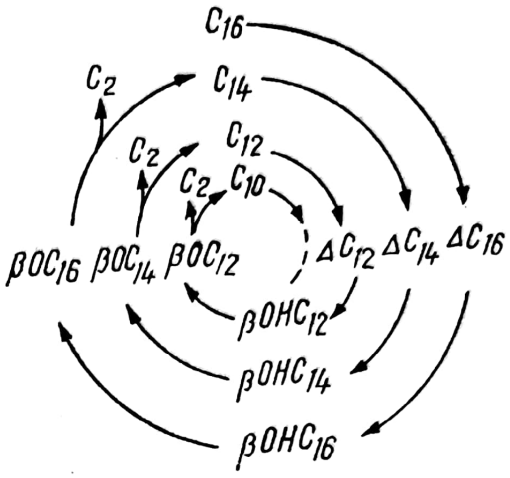


Fig. X.5. Spirala de oxidare a acizilor graşi:
(Prescurtări: C_{16}, C_{14} etc.=derivatul acil-CoA
ΔC_{16}, ΔC_{14} etc.=enoil-CoA
β-OH C_{16}, β-OH C_{14} etc.=β-hidroxil-acil CoA
β-OC_{16}, β-OC_{14} etc.=β-cetoacil CoA
C_2=acetil-CoA)

ţinem seama că β-oxidarea acidului palmitic duce la formarea a opt molecule de acetil-CoA, acestea în ciclul acizilor tricarboxilici vor deveni:

$$8CH_3-CO\sim SCoA+16H_2O+24NAD^++8FAD+8ADP+8P_i \rightarrow$$
$$16CO_2+24NADH+24H^++8FADH_2+8ATP+8CoASH$$

Oxidarea coenzimelor NADH şi $FADH_2$ în lanţul respirator poate fi redată prin ecuaţiile:

$$31NADH+31H^++\frac{31}{2}O_2+93\ ADP+93\ P_i \rightarrow 31\ NAD^++124\ H_2O+93\ ATP$$

şi

$$15\ FADH_2+\frac{15}{2}O_2+30\ ADP+30\ P_i \rightarrow 15\ FAD+45\ H_2O+30\ ATP$$

Bilanţul energetic al arderii acidului palmitic constă în sinteza cuplată a 131 molecule de ATP, dintre care 8 molecule prin oxidări în ciclul acizilor

Scanned with OKEN Scanner

tricarboxilici iar restul prin fosforilări cuplate cu funcţionarea lanţului respirator. Activarea acidului gras la acetil-CoA consumă o legătură fosfat macroergică, astfel că beneficiul energetic net al arderii acidului palmitic este de 130 legături fosfat macroergice. Randamentul de conservare a energiei este ridicat, de 40%.

Degradarea acizilor nesaturaţi. O fracţiune importantă din acizii graşi ai grăsimilor animale o reprezintă acizii nesaturaţi, acidul oleic şi acidul linoleic. Degradarea acestora are loc prin repetarea secvenţei β-oxidative pînă cînd reacţia de tioliză conduce la formarea unui derivat enoil-CoA care cuprinde legătura dublă în Cβ—Cγ şi nu între Cα şi Cβ, care este poziţia normală a dublei legături în derivaţii tipici enoil-CoA ai β-oxidării. Pentru a putea fi continuată β-oxidarea, acest derivat atipic este izomerizat prin migrarea legăturii etilenice. β-Oxidarea oleil-CoA poate fi schematizată astfel:

$$CH_3-(CH_2)_7-CH=CH-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CO\sim SCoA$$

oleil-CoA

3 acetil-CoA ← | 3× β-oxidare

$$CH_3-(CH_2)_7-CH=CH-CH_2-CO\sim SCoA$$

β-enoil-CoA

↓

$$CH_3-(CH_2)_7-CH_2-CH=CH-CO\sim SCoA$$

α-enoil-CoA

↓ 4×β- oxidare

5 acetil-CoA

3.1.2. BIOSINTEZA ACIZILOR GRAŞI

Sinteza acizilor graşi este un proces foarte activ deţinînd un rol principal în stocarea rezervelor energetice ale organismului. Capacitatea organismului de a depozita glucoză sub formă de glicogen este limitată, astfel încît glucoza care prisoseşte peste nevoile imediate şi nu poate fi păstrată ca glicogen este convertită în acizi graşi şi depozitată ca trigliceride în toate ţesuturile, în mod preponderent în ţesutul adipos. Proteinele alimentare, într-o măsură redusă, furnizează şi ele material pentru sinteză de acizi graşi.

Precursorul acizilor graşi este acetil-CoA. Aceasta provine în principal din glucoză, via secvenţa Embden-Meyerhof pînă la acid piruvic urmată de decarboxilarea oxidativă a acestuia. Acizii graşi, care au un număr par de atomi de carbon, rezultă în principiu prin legarea cap-coadă a unităţilor de doi atomi de carbon furnizate de acetil-CoA. Totuşi acetil-CoA este un metabolit situat la răscrucea multor secvenţe catabolice sau anabolice şi canalizarea lui în spre sinteză de acizi graşi implică o pregătire a sa în acest scop, o activare. Forma sub care acetil-CoA intră în secvenţa de biosinteză a acizilor graşi este malonil-CoA ($HOOC-CH_2-CO\sim SCoA$). Transformarea acetil-CoA în malonil-CoA are loc printr-o reacţie de carboxilare, catalizată de acetil-CoA carboxilaza:

$$CH_3-CO\sim SCoA+ATP+CO_2+H_2O \rightarrow HOOC-CH_2-CO\sim SCoA+ADP+P_i$$

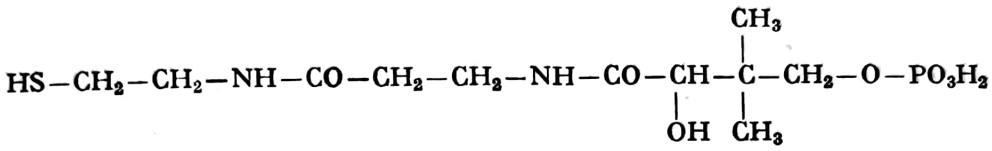
Această reacţie este etapa reglatoare a biosintezei acizilor graşi; acetil-CoA carboxilaza este activată alosteric de către acidul citric sau izocitric. Acidul

Scanned with OKEN Scanner

citric el singur este obţinut din acetil-CoA (prin condensare cu acid oxaloacetic) şi acumularea sa intracelular indică saturarea ciclului acizilor tricarboxilici şi surplusul de acetil-CoA este dirijat spre sinteză de acizi graşi.

Sinteza de novo a acizilor graşi este catalizată de un complex enzimatic — acid gras sintetază — proteină oligomeră în care diversele subunităţi exercită fiecare o anumită activitate catalitică. Sintetaza cuprinde enzime cu activităţi similare cu acelea exercitate de către enzimele β-oxidării, dar în complexul sintetazic ele se desfăşoară în sens opus: hidrogenarea unui acid nesaturat, deshidratarea unui β-hidroxiacid şi hidrogenarea unui β-cetoacid, condensarea de tip aldolic a două molecule de acid.

Acizii intermediari — β-cetoacidul, β-hidroxiacidul şi acidul nesaturat — se găsesc în complexul sintetazic sub formă de tiolesteri ai unei substanţe înrudite cu coenzima A, fosfopanteteina:



Aceasta este legată prin gruparea sa fosforil de resturi de serină din proteină. Din acid gras sintetaza bacteriană s-a obţinut o proteină conjugată cu greutate moleculară mică cu fosfopanteteină drept grupare prostetică. Această proteină formează tiolesteri cu diverşi acizi şi a primit denumirea de proteină transportoare de acil (PTA-SH sau acyl carrier protein). Acid gras sintetazele din ţesuturile mamiferelor cuprind de asemenea resturi de fosfopanteteină dar aceste sisteme multienzimatice nu au putut fi scindate, fără pierderea activităţii în componente.

Prima reacţie de sinteză a unui acid gras constă în condensarea unui rest acetil cu un rest malonil, însoţită de decarboxilare, formîndu-se derivatul β-cetonic al acidului butiric. Toate celelalte unităţi a cîte doi atomi de carbon provin imediat din resturi malonil. Prin urmare la sinteza acidului palmitic participă o moleculă de acetil-CoA care va furniza atomii C_{15} şi C_{16} şi 7 molecule de malonil-CoA. Pentru ca aceşti radicali acil (CH_3-CO- şi $HOOC-CH_2-CO-$) să participe la sinteza de acid gras ei vor fi mai întîi transferaţi din legătura lor cu coenzima A la fosfopanteteina din proteina transportoare de acil (PTA-SH):

$$\text{malonil-CoA} + \text{PTA-SH} \rightarrow \text{malonil-PTA} + \text{CoASH}$$

$$\text{acetil-CoA} + \text{PTA-SH} \rightarrow \text{acetil-PTA} + \text{CoASH}$$

În fig. X.6 se arată reacţiile primului tur al ciclului de sinteză a acidului palmitic pînă la butiril-S-PTA. Prin repetarea acestei secvenţe se obţine palmitil-S-PTA care este în final detaşat hidrolitic din legătura sa tiolesterică. Diversele enzime ale ciclului de sinteză acţionează concertat şi intermediarii nu sînt eliberaţi din complexul enzimatic. Acidul palmitic este singurul produs al secvenţei.

Sintetaza acizilor graşi este localizată în faza solubilă a celulei în citosol. Întrucît acetil-CoA care serveşte ca materie primă pentru biosinteza de acizi graşi se formează intramitocondrial se pune problema transferului acestui

Scanned with OKEN Scanner

compus prin membrana mitocondrială impermeabilă. Transportul acetil-CoA din mitocondrii în citosol are loc prin transformarea sa intramitocondrială în citrat (sub acţiunea citrat sintetazei), traversarea membranei în această formă, apoi într-o reacţie catalizată de citrat liază, acidul citric este scindat în acetil-CoA şi acid oxaloacetic. În fig. X.7 se arată schematic funcţionarea acestui sistem de transport al acetil-CoA prin membrana mitocondrială.

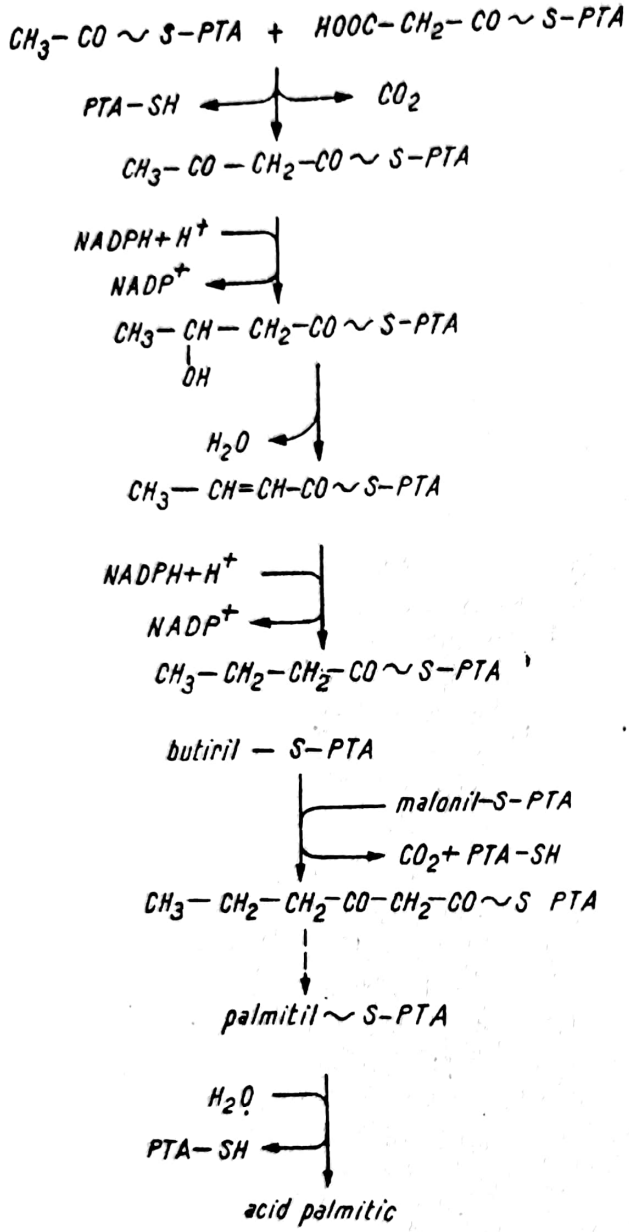


Fig. X.6. Sinteza acidului palmitic.

Sinteza acizilor graşi este un proces endergonic şi are loc cu consum de energie chimică. Pe de o parte activarea acetil-CoA la malonil-CoA consumă cîte o legătură fosforică macroergică din ATP. În acidul palmitic 7 din cele 8 perechi de atomi de carbon provin din malonil-CoA. Totodată hidrogenul activat sub formă de NADPH reprezintă o cantitate considerabilă de energie chimică potenţială ce este încorporată în molecula acidului gras. Din aceste motive sinteza de acizi graşi nu este posibilă decît atunci cînd organismul dispune de un surplus de substrate energogene.

Ecuaţia globală a sintezei acidului palmitic:

$$8\ \text{acetil-CoA} + 14\ \text{NADPH} + 14\ H^+ + 7\ \text{ATP} \rightarrow$$
$$\text{acid palmitic} + 8\ \text{CoASH} + 14\ NADP^+ +$$
$$7\ \text{ADP} + 7\ P_i + 6\ H_2O$$

arată consumul de ATP şi de NADPH în acest proces. NADPH-ul este furnizat fie de degradarea glucozei pe calea fosfogluconatului fie prin transferul în citosol al echivalenţilor reducători generaţi intramitocondrial în ciclul acizilor tricarboxilici şi transferul lor din NADH în NADPH. La acest proces participă malat-dehidrogenaza mitocondrială şi enzima malică din citosol. Membrana mitocondrială este impermeabilă pentru NADH şi NADPH în ambele sensuri. În schimb, acidul malic este uşor penetrabil şi trecerea lui din mitocondrie în citosol corespunde transferului unei perechi de atomi de hidrogen. În fig. X.8 se arată cum funcţionează acest mecanism de sinteză a NADPH-ului.

Elongarea acizilor graşi. Alături de mecanismul de sinteză de novo a unui acid gras din acetil-CoA, organismul dispune de un sistem enzimatic prin care

Scanned with OKEN Scanner

acizii graşi de origine endogenă sau exogenă sînt alungiţi prin adăugarea de fragmente de cîte doi atomi de carbon. Unităţile de doi atomi de carbon sînt furnizate imediat de acetil-CoA în sistemul de elongare mitocondrial sau de

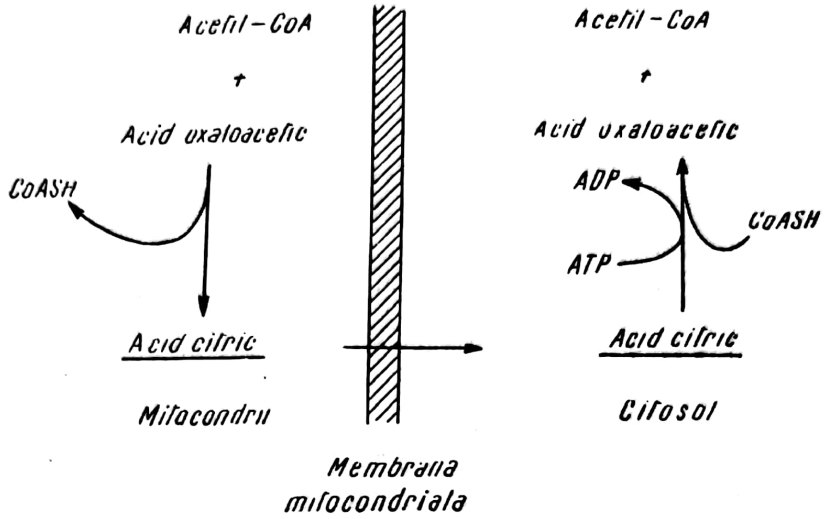


Fig. X.7. Transferul acetil-CoA din spaţiul intramitocondrial în citosol.

malonil-CoA în sistemul enzimatic localizat pe reticulul endoplasmic. Prin elongare acizii graşi alimentari sînt remaniaţi pentru a corespunde caracteristicilor proprii fiecărui ţesut.

Biosinteza acizilor nesaturaţi. Acizii nesaturaţi mono- sau polietilenici sînt constituenţi ai tuturor categoriilor de lipide. Ţesuturile animale pot sintetiza numai unii dintre acizii nesaturaţi, fiind inapte de a obţine pe alţii. Acizii monoetilenici sînt uşor sintetizaţi pornindu-se de la acizii saturaţi corespunzători, prin introducerea unei legături duble. Acidul oleic ($C_{18:9}$) şi acidul palmitoleic ($C_{16:9}$) sînt obţinuţi prin desaturarea acidului stearic şi, respectiv, palmitic. Sistemul enzimatic care introduce legătura dublă în catena alifatică acţionează mai întîi prin hidroxilarea unei grupări $—CH_2—$

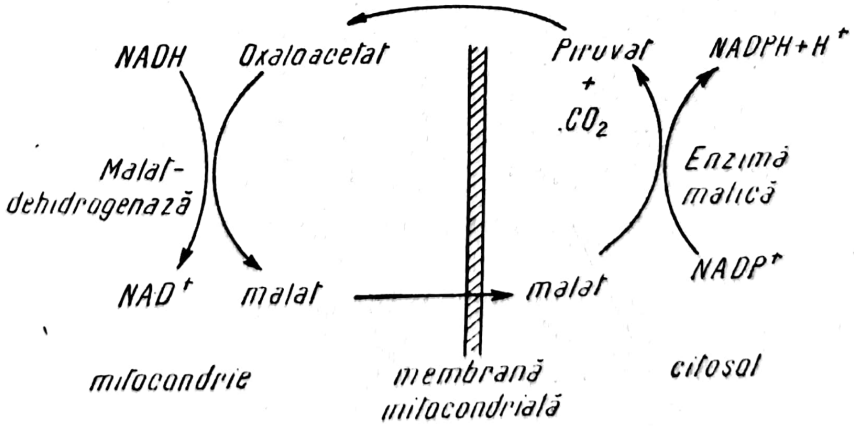


Fig. X.8. Transferul hidrogenului din mitocondrii în citosol prin intermediul acidului malic.

ca apoi prin eliminare de apă să rezulte legătura etilenică. Acest sistem enzimatic hidroxilant utilizează oxigenul molecular ca agent oxidant şi NADPH-ul

Scanned with OKEN Scanner

drept co-reducător. Reacţia de desaturare este redată prin ecuaţiile:

$$-CH_2-CH_2- + O_2 + NADPH + H^+ \rightarrow \underset{\displaystyle OH}{\overset{\displaystyle |}{-CH-}}-CH_2- + NADP^+ + H_2O$$

$$-\underset{\displaystyle OH}{\overset{\displaystyle |}{CH}}-CH_2- \rightarrow -CH=CH- + H_2O$$

Acidul linoleic şi acidul linolenic nu sînt sintetizaţi în ţesuturile animale. Nevoile organismului în aceşti compuşi sînt împlinite de acizii cuprinşi în alimente. Pentru aceasta ei sînt denumiţi acizi graşi esenţiali. Plantele sintetizează aceşti compuşi şi grăsimile vegetale sînt furnizorul de acid linoleic, care este principalul acid gras esenţial. Acidul linoleic este un constituent specific al fosfatidelor şi al esterilor colesterolului. Aproximativ 50% din resturile acil din esterii colesterolului sînt radicali linoleil; de asemenea, restul acil de la C_2 din lecitine provine în majoritate de la acidul linoleic. Aceste lipide iau parte la sinteza lipoproteinelor plasmatice şi a membranelor lipoproteice, fapt care explică indispensabilitatea acizilor polietilenici.

Acidul arahidonic ($C_{20:5,\ 8,\ 11,\ 14}$), un acid tetraetilenic, joacă în organism un rol foarte important, fiind precursorul unui grup de substanţe foarte active — prostagladinele. Prostagladinele sînt prezente în toate ţesuturile şi lichidele din organism, ele acţionează ca modulatori ai acţiunii hormonilor.

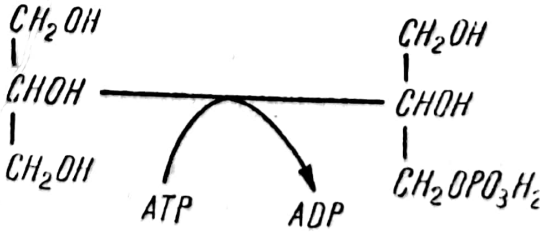
Acidul arahidonic poate fi obţinut prin sinteză endogenă plecîndu-se de la acidul linoleic. De fapt, acidul arahidonic este prezent numai în grăsimile de origine animală. Transformarea acidului linoleic în acid arahidonic are loc printr-o secvenţă de reacţii care cuprind două reacţii de desaturare şi o reacţie de elongare. Această secvenţă poate fi redată schematic astfel:

acid linoleic ($C_{18;\ 9,\ 12}$)
↓ desaturare la C_6
acid γ-linolenic ($C_{18;\ 6,\ 9,\ 12}$)
↓ elongare
acid eicosatrienoic ($C_{20;\ 8,\ 11,\ 14}$)
↓ desaturare la C_5
acid arahidonic($C_{20;\ 5,\ 8,\ 11,\ 14}$)

Sinteza de prostaglandine, via acid arahidonic, reprezintă o altă funcţie a acidului linoleic.

3.2. METABOLISMUL GLICEROLULUI

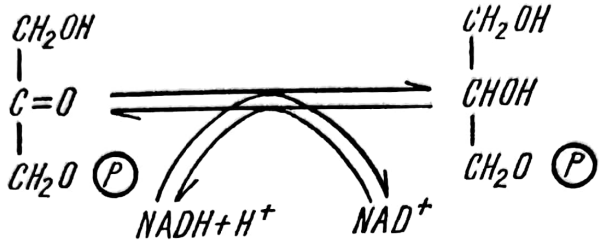
Glicerolul liber se formează în ţesuturi prin hidroliza completă a trigliceridelor şi a altor glicerolipide. Acesta poate fi utilizat în trei moduri: degradare oxidativă, reesterificare la trigliceride şi alte lipide şi, în sfîrşit, poate fi transformat în glucoză (gluconeogeneză). În toate aceste căi metabolice glicerolul pătrunde după esterificarea sa la glicerol-fosfat, sub acţiunea unei kinaze de o înaltă specificitate, glicerol-kinaza:



Scanned with OKEN Scanner

Această enzimă este prezentă numai în unele țesuturi (ficat, intestin) și lipsește în altele (țesut adipos). Absența glicerol kinazei în țesutul adipos, sediul unui metabolism intens al trigliceridelor, are repercusiuni adînci în economia întregului organism. Ficatul posedă o glicerol kinază activă, fiind țesutul care deține rolul principal în utilizarea metabolică a glicerolului liber.

Glicerol-fosfatul se mai formează în țesuturi din glucoză, respectiv dintr-un intermediar al secvenței glicolitice Embden-Meyerhof, dihidroxi-acetono-fosfat:

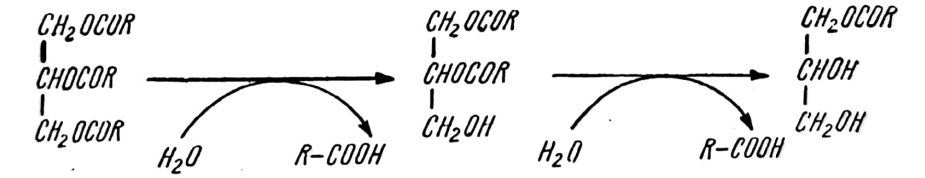


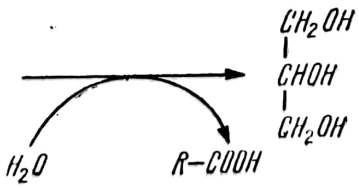
Această transformare reversibilă, catalizată de glicerol-fosfat dehidrogenază, constituie totodată și o cale de pătrundere a glicerol-fosfatului în secvența Embden-Meyerhof pe care o poate urma fie în sens degradativ, fie în sens anabolic, spre gluconeogeneză.

3.3. METABOLISMUL TRIGLICERIDELOR

3.3.1. HIDROLIZA

Degradarea tisulară a trigliceridelor este catalizată de esteraze - lipaze. Enzimele intracelulare sînt puțin cunoscute. Totuși, s-a stabilit că hidroliza are loc în trepte, de la triglicerid la diglicerid, apoi la monoglicerid și glicerol:





Cele trei etape sînt catalizate de enzime distincte. Reacția cea mai lentă, limitantă de viteză, este prima etapă, fapt ce explică de ce nu se acumulează în celule produșii intermediari, digliceridele și monogliceridele. Acestea sînt hidrolizate cu o viteză mai mare decît viteza cu care se formează.

Lipaza care hidrolizează trigliceridele din țesutul adipos (triglicerid-lipaza) răspunde de viteza cu care sînt mobilizate aceste depozite de energie chimică ale organismului și este supusă unui control riguros hormonal și nutri-

Scanned with OKEN Scanner

ţional (a se vedea paragraful următor). O enzimă distinctă hidrolizează triogliceridele plasmatice. Întrucît acestea sînt încorporate în complexe lipoproteice, enzima este denumită lipoprotein-lipază şi are o localizare tisulară corespunzătoare, se află în membrana celulelor endoteliilor capilare.

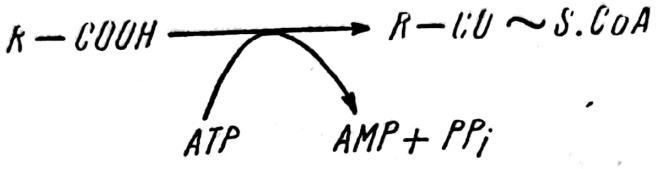
3.3.2. BIOSINTEZA TRIGLICERIDELOR

Pentru sinteza trigliceridelor organismul utilizează două modalităţi care diferă prin natura precursorului care furnizează un rest de glicerol activ:

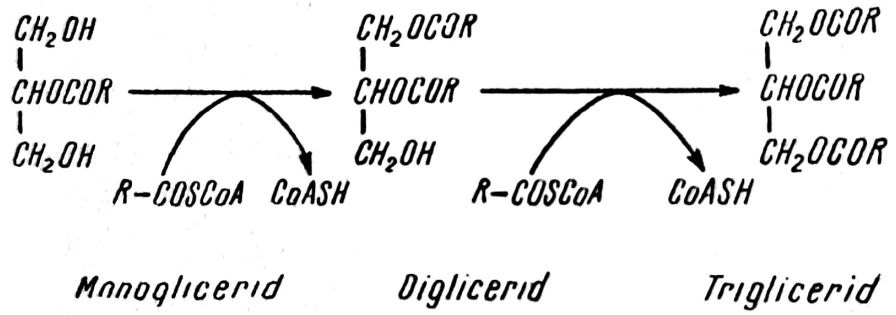
a) calea monogliceridelor,

b) calea glicerol-fosfatului.

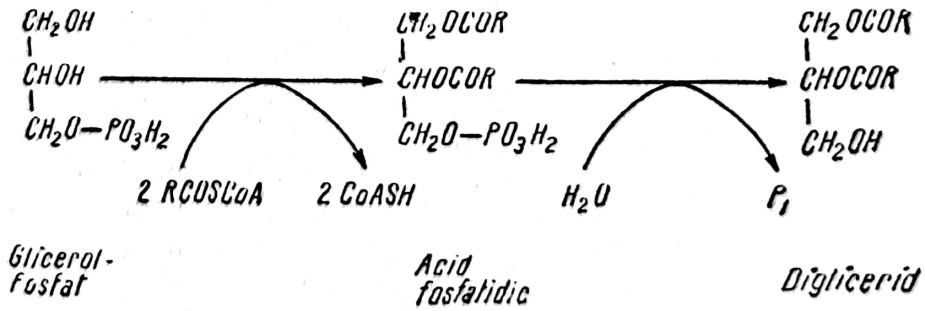
Radicalii acil, R-CO-, sînt furnizaţi de derivaţii tiol-esterici macroergici, R-CO~S-CoA, obţinuţi prin reacţia dependentă de ATP, catalizată de tiokinază:

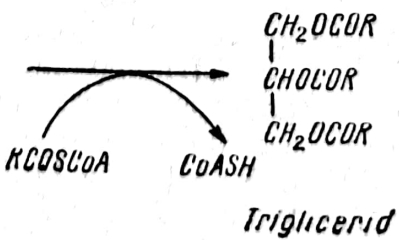


Calea monogliceridelor funcţionează doar în intestin şi reprezintă o cale rapidă şi economică de resinteză a trigliceridelor în enterocit plecînd de la produşii digestiei luminale a grăsimilor:



Calea glicerol-fosfatului este calea de sinteză a trigliceridelor în toate celelalte ţesuturi ale organismului. Reacţiile care alcătuiesc această cale metabolică sînt:





Funcționalitatea acestei căi depinde de o sursă de glicerol-fosfat care poate fi obținut din glicerol prin fosforilare cu ATP (în prezența glicerol kinazei) sau din glucoză, via dihidroxiacetono-fosfat. Mai trebuie subliniat că etapele pînă la acid fosfatidic sînt comune și pentru sinteza de glicerofosfolipide.

3.4. METABOLISMUL FOSFATIDELOR

Asocierile supramoleculare dintre proteine și fosfolipide reprezintă elementele structurale ale membranelor. Fiecare tip de celulă cuprinde un mozaic de fosfatide și de alte lipide (sfingolipide, colesterol) în raporturi bine determinate. Specificitatea și constanța compoziției lipidice a membranelor lipoproteice și a lipoproteinelor solubile dovedește că fiecare tip de moleculă lipidică are un rol bine determinat în realizarea unui edificiu cu funcții specifice.

Fosfolipidele celulare se află într-o stare dinamică, ele sînt degradate și resintetizate continuu. Fosfolipidele din reticulul endoplasmatic al hepatocitului au un timp de înjumătățire de numai cîteva zile, resturile acil fiind reînnoite mult mai repede decît glicerolul. Mai mult decît atît, viața medie a unei molecule de fosfolipide este mult mai scurtă decît viața componentelor proteice ale membranelor. Reînnoirea rapidă a fosfolipidelor și în special a resturilor acil se explică prin sensibilitatea catenelor nesaturate ale acizilor grași la atacuri peroxidative.

Transformările metabolice ale fosfolipidelor constau din:

a) dislocarea moleculelor la compuși simpli, acizi grași, glicerol-fosfat și colină sau un alt alcool azotat;

b) sinteza fosfatidelor din precursori liberi;

c) schimbul unor componente din moleculele de fosfolipide (resturi acil, restul de alcool azotat) cu substanțele libere;

d) interconversiunea fosfolipidelor prin modificarea chimică a resturilor de alcool-azotat.

Schimbul de componente, interconversiunea diverselor categorii de fosfatide, alături de degradarea parțială și reutilizarea produșilor, permite redistribuirea componenților între diversele tipuri de molecule, proces prin care se remaniază compoziția fosfolipidelor asigurîndu-se specificitatea morfofuncțională a fiecărei membrane.

3.4.1. DEGRADAREA FOSFATIDELOR

Dislocarea tisulară a lecitinelor conduce la acizi grași, colină și glicerol-fosfat prin hidroliza legăturilor acil-glicerol și fosforil-colină. Aceste reacții sînt catalizate de fosfolipaze cu specificități distincte, astfel că ele acționează secvențial, produsul unei reacții fiind substratul specific al altei fosfolipaze. În fig. X.9 se prezintă schematic reacțiile de hidroliză a unui fosfatid. Detașarea primului rest acil este catalizată de două enzime, una cu specificitate

Scanned with OKEN Scanner

pentru legătura esterică de la C_1 (fosfolipază A_1) şi alta pentru cea de la C_2 (fosfolipază A_2). Din lizofosfatide cel de al doilea rest acil este detaşat sub acţiunea lizofosfolipazei, iar legătura fosfat-alcool azotat (de exemplu fosforil-colină) este ruptă de o altă fosfolipază (fosfolipaza C, care este o fosfodiesterază). Aceste fosfolipaze au fost identificate în ţesuturile mamiferelor dar se

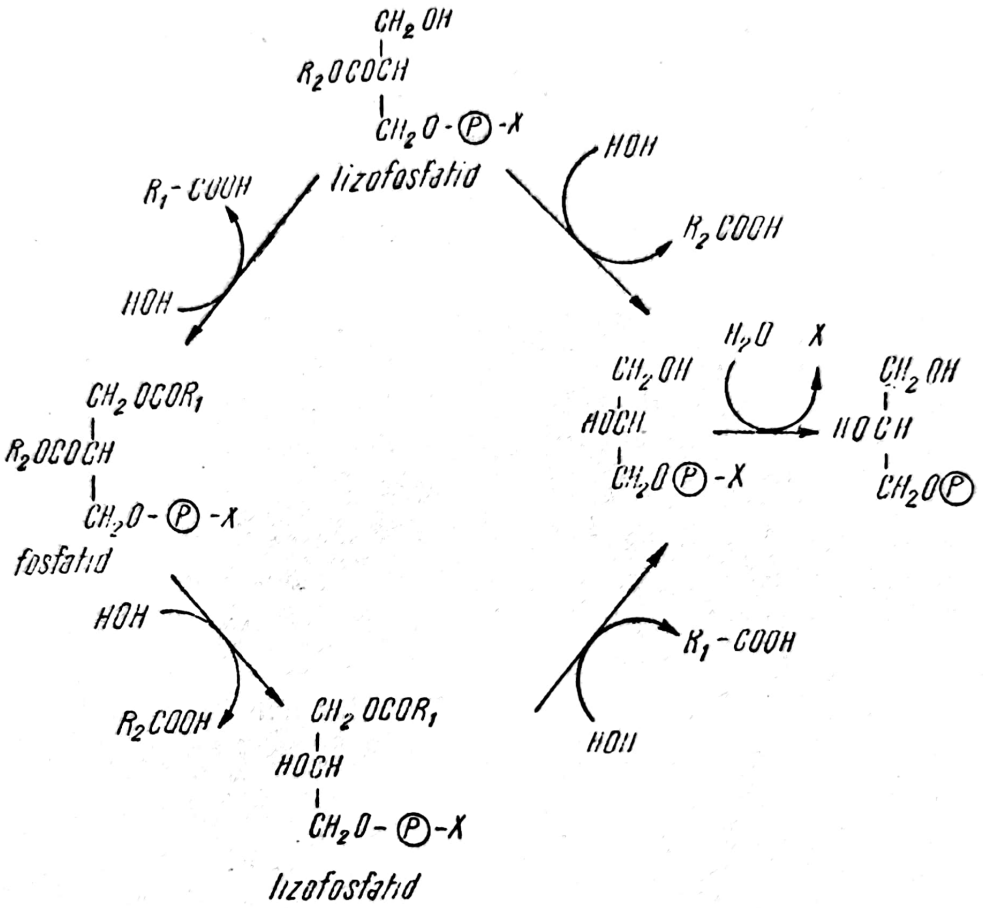
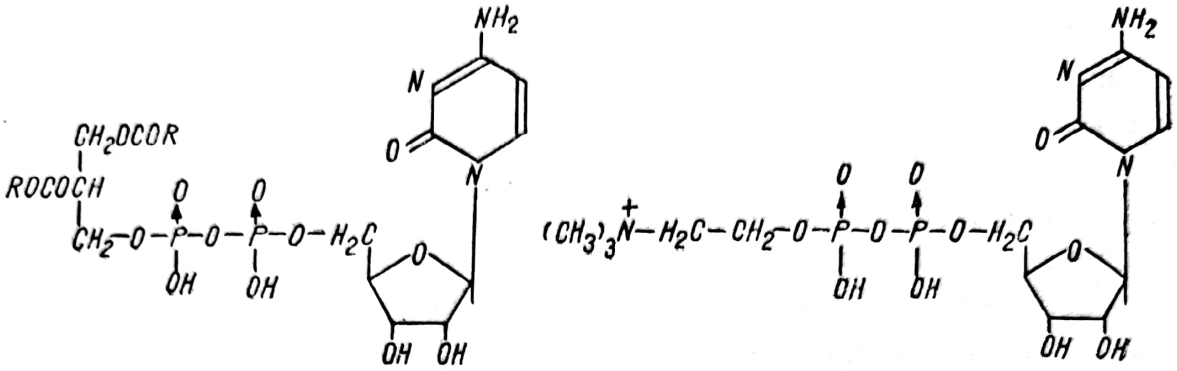


Fig. X.9. Degradarea tisulară a unui fosfatid
(X=colină, etanolamină sau serină)

cunosc puţine lucruri cu privire la activităţile lor relative. De aceea, nu este foarte bine precizat rolul diverselor fosfolipaze în procesul de reînnoire a fosfatidelor.

3.4.2. SINTEZA DE NOVO A FOSFATIDELOR

Acest proces constă în sinteza unei molecule de fosfatid plecîndu-se de la acizi graşi, glicerol, acid fosforic şi molecula X. Intermediarul comun pentru sinteza diverselor categorii de fosfatide este acidul fosfatidic, obţinut aşa cum s-a arătat la sinteza trigliceridelor. O particularitate a biosintezei fosfatidelor este participarea unor precursori în forme active de derivaţi ai citidin-difosfatului. Aceşti compuşi sînt asemănători derivaţilor UDP-glicozil, ei cuprind o legătură fosfat macroergică care acoperă efectul energetic nefavorabil al unei reacţii de esterificare. Aceşti derivaţi CDP sînt CDP-diglicerid, CDP-colină, CDP-etanolamină. Ei au constituţiile următoare:



CDP-diglicerid CDP-colină

Derivaţii CDP-diglicerid sînt obţinuţi prin reacţia:

acid fosforic + CTP → CDP-diglicerid + PP_i

Colina este activată la CDP-colină astfel:

colină + ATP → ADP + fosforil-colină

fosforilcolină + CTP → CDP-colină + PP_i

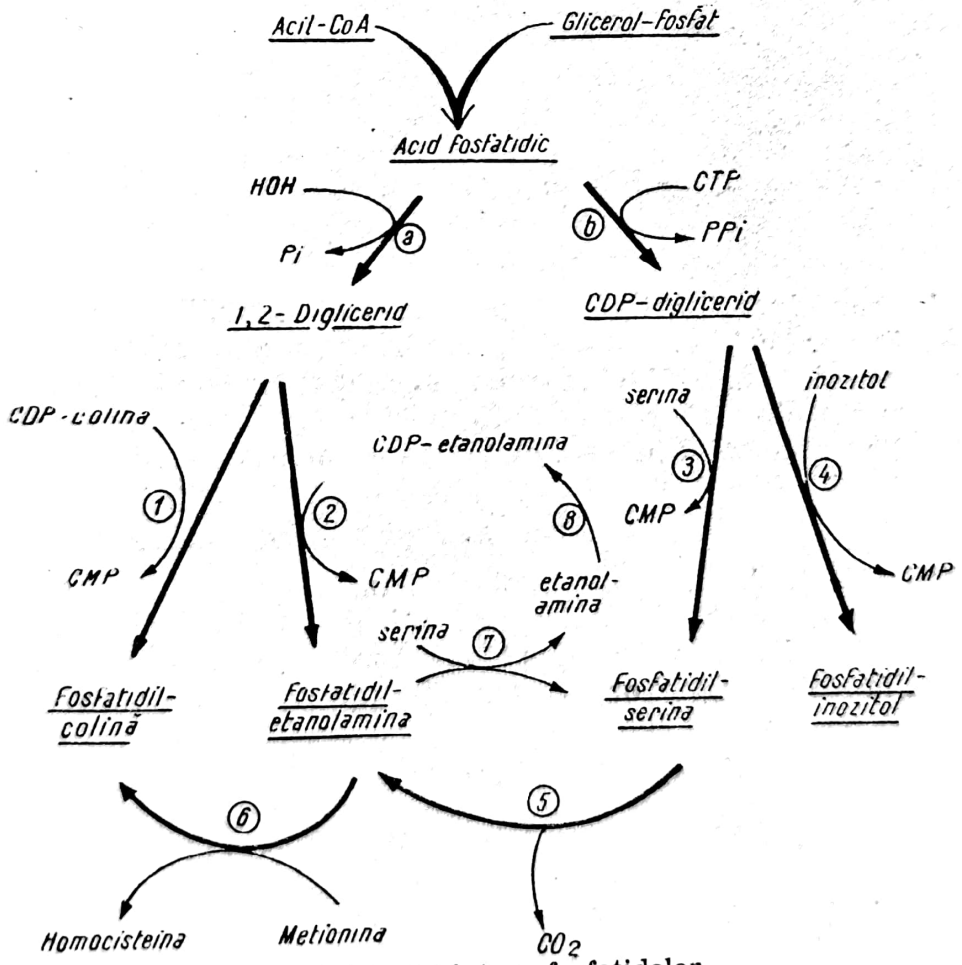


Fig. X.10. Biosinteza fosfatidelor.

CDP-etanolamina este obţinută şi ea prin reacţii asemănătoare.

În figura X.10 sînt arătate căile de sinteză a fosfatidelor. Acidul fosfatidic este punctul de plecare pentru toate căile. De la acest compus se despart două căi principale de sinteză:

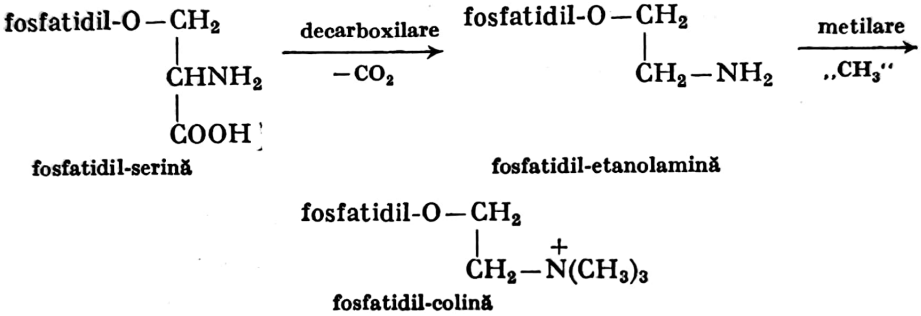
a) Acidul fosfatidic este hidrolizat la 1,2-diglicerid și acesta este esterificat la C_3 cu un rest de fosforil-colină (1, 2) sau de fosforil-etanolamină.

b) Acidul fosfatidic este activat la CDP-diglicerid și acesta reacționează cu serină (3) sau cu inozitol (4) dînd naștere la fosfatidil-serine sau la fosfatidil-inozitoli. După unii autori reacția (3) ar juca un rol minor în sinteza fosfatidil-serinelor. Calea principală de obținere a fosfatidil-serinelor este reacția (7) prin care un rest de etanolamină din fosfatidil-etanolamine este schimbat cu un rest de serină:

$$\text{Fosfatidil-etanolamină} + \text{serină} \longrightarrow \text{fosfatidil-serină} + \text{etanolamină}$$

Etanolamina liberă, via CDP-etanolamină, va putea fi din nou încorporată în molecule de fosfatide.

Fosfatidil-serinele deși sînt cuprinse în cantități mici în amestecul de fosfatide celulare, totuși joacă roluri importante în biosinteza fosfatidil-colinelor, sînt precursori ai acestora (reacțiile 5 și 6). Fosfatidil-serinele prin decarboxilare dau naștere la fosfatidil-etanolamine iar acestea prin metilare se transformă în fosfatidil-coline:



fosfatidil-serină — fosfatidil-etanolamină — fosfatidil-colină

Donorul de grupări metil active este adenozil-metionina. Posibilitatea sintezei fosfatidil-colinelor (lecitine) în ficat pornind de la serină ca furnizor de resturi de etanolamină și de la metionină ca donor de grupări metil explică rolul proteinelor în metabolismul fosfatidelor în acest organ (a se vedea ficatul gras). O altă reacție metabolică importantă la care participă lecitinele este următoarea:

$$\text{fosfatidil-colină} + \text{colesterol} \rightarrow \text{acil-colesterol} + \text{2-lisofosfatidil-colină (lizolecitină)}$$

Este catalizată de lecitino-colesterol-aciltransferază (LCAT), reacție prin care restul acil de la C_2 din molecula lecitinei este transferat pe colesterol. Enzima este sintetizată în ficat dar locul ei principal de acțiune este plasma și participă la sinteza esterilor colesterolului din plasmă.

4. LIPIDELE PLASMATICE

4.1. ANALIZA LIPIDELOR PLASMATICE

Trigliceridele din țesutul adipos și din celelalte țesuturi reprezintă cel mai important depozit de rezerve energetice ale organismului. Aceste depozite se formează din grăsimile ingerate în exces sau sînt forma de stocare a surplusului de glucide. Transportul trigliceridelor alimentare și a celor sintetizate endogen la locurile de depozitare și apoi distribuția lor către organele consumatoare presupune un flux plasmatic continuu de trigliceride și de alte categorii de lipide. Trigliceridele hidrofobe sînt transportate într-un mediu apos

Scanned with OKEN Scanner

în asociere cu lipide polare şi cu proteine sub formă de lipoproteine. Aceste lipoproteine cuprind diverşii componenţi în proporţii relativ constante ceea ce denotă existenţa unor interacţiuni cu un înalt grad de specificitate. Legăturile prin care se realizează asociaţiile lipide — lipide şi lipide — proteine sînt în primul rînd interacţiuni fizice, ca atracţii ionice, forţe van der Waals, atracţii polare, legături de hidrogen dar pot fi şi interacţiuni chimice prin legături covalente.

Lipidele plasmatice pot fi analizate prin două procedee. Un gen de analiză constă în separarea lipidelor de proteine, după care componentele lipidice sînt fracţionate în categorii chimice ca trigliceride, fosfolipide, colesterol, acizi graşi. În tabelul X.3 sînt arătate concentraţiile plasmatice (în mg/100 ml) ale diverselor componente lipidice la un adult sănătos, dimineaţa după 10—12 ore de post.

Tabelul X.3

Concentraţia lipidelor plasmatice*

Fracţiunea lipidică	Concentraţia în mg/100 ml
Lipide totale	600—700
Trigliceride	50—150
Acizi graşi liberi	5—25
Colesterol total	150—220
Colesterol liber	40—50
Fosfolipide	160—260

*după M. Cucuianu — Biochimie clinică, Editura Dacia, Cluj-Napoca, 1977

Un alt mod de a aborda studiul lipidelor plasmatice constă în separarea lipoproteinelor ca entităţi morfo-funcţionale şi cercetarea compoziţiei lor proteice şi lipidice. Prin acest gen de analize s-a putut înţelege dinamica lipidelor plasmatice, geneza şi modul lor de utilizare. Lipoproteinele plasmatice pot fi separate prin ultracentrifugare care se bazează în primul rînd pe diferenţele de densitate ale diverselor fracţiuni sau prin metoda electroforetică care diferenţiază componentele după viteza lor de migrare în cîmp electric.

În metoda ultracentrifugării plasma diluată cu o soluţie salină este supusă într-o ultracentrifugă unui cîmp de acceleraţie foarte puternic. Particulele cu densităţi mai mari decît ale mediului cad potrivit mărimii şi densităţii lor. În schimb particulele cu densităţi mai mici decît ale mediului de suspensie au tendinţa de a se ridica în sus, flotează deasupra mediului. În cîmpuri centrifugale care întrec de aproximativ 100 000 de ori acceleraţia gravitaţiei (100 000 $\times$ g) este posibilă separarea unor componente între care există diferenţe foarte mici în ceea ce priveşte densităţile lor. Lipidele, în general, au densităţi mai mici decît apa. Trigliceridele pure au densitatea cea mai mică, de 0,95 g/cm^3. Proteinele în schimb sînt mai grele decît apa, au densităţi mai mari de 1,20 g/cm^3. Lipoproteinele au densităţi intermediare în raport cu conţinutul lor în lipide şi în proteine. Acelea care cuprind lipide într-o proporţie mare au densităţi mult mai mici decît 1,20 g/cm^3. Lipoproteinele plasmatice constituie o populaţie heterogenă cu raporturi diferite între lipide şi proteine şi pot fi separate prin ultracentrifugare (sau flotaţie). În acest scop se diluează plasma cu o soluţie de clorură de sodiu pentru a se obţine un mediu cu o densitate de 1,063 g/cm^3. Această valoare este aleasă arbitrar, ea corespunde densităţii unei lipoproteine cu un conţinut egal de lipide şi proteine. Această soluţie este apoi centrifugată la 100 000 $\times$ g. Lipoproteinele se separă în fracţiuni potrivit densităţii fiecăreia. Fracţiunile cu densităţi mai mici de 1,063 g/cm^3 vor tinde să se ridice în sus, pe cînd cele mai grele se vor deplasa spre fundul tubului de centrifugă. Albuminele şi fracţiunile globu-

Scanned with OKEN Scanner

Tabelul X.4

Lipoproteinele plasmatice

Fracțiunea	Concentrație mg/100 ml	Greutate moleculară (daltoni)	Mărime (Å)	Mobilitate electroforetică	Densitate g/cm³	Lipide %	Trigliceride %	Proteine %	Fracțiuni lipidice %			
									Fosfolipide	Colesterol — esterificat	Colesterol liber	Acizi grași
Chilomicroni	0—50	—	1 000—5 000	—	0,96	99	88	1	8	3	1	—
Lipoproteine cu densitate foarte mică (VLDL)	150	$5-10\times10^6$	300—900	pre-β	0,96—1,006	93	56	7	20	15	8	1
Lipoproteine cu densitate mică (LDL)	350	$1-3\times10^6$	200—290	β	1,006—1,063	84	21	16	27	41	10	1
Lipoproteine cu densitate mare (HDL)	390	$1-4\times10^6$	100—170	α	1,063—1,21	55	15	45	45	30	8	2
Acizi grași-albumine	4 000	—	—	albumine	—	1	0	99	0	0	0	100

linice care nu sînt asociate cu lipide se depun la fundul tubului de centrifugă, constituind ceea ce se numește reziduul centrifugal. Prin ultracentrifugare în soluții saline se obțin următoarele fracțiuni lipoproteice:

— Lipoproteine cu densitate mare (high density lipoproteins, HDL) cu $d=1{,}63-1{,}21$ g/cm³.

— Lipoproteine cu densitate mică (low density lipoproteins, LDL) cu $d=1{,}006-1{,}063$ g/cm³.

— Lipoproteine cu densitate foarte mică (very low density lipoproteins, VLDL), $d=0{,}96-1{,}006$ g/cm³.

— Chilomicronii cu densitate de 0,96 g/cm³.

Aceste fracțiuni lipoproteice nu sînt omogene și pot fi subfracționate în medii cu densități potrivite. În tabelul X.4 sînt prezentate cîteva caracteristici ale lipoproteinelor plasmatice și compoziția lipidică a fiecărei fracțiuni. Conținutul în proteine al diverselor lipoproteine este minim la chilomicroni (1%) și ajunge aproximativ 50% în lipoproteinele cu densitate mare. În tabelul X.4 este prezentată ca o fracțiune lipoproteică asociația dintre albumine și acizii grași; aceștia din urmă fiind greu solubili în apă, sînt vehiculați în sînge de către albumine.

O a doua metodă de separare a lipoproteinelor este metoda electroforetică. Datorită sarcinilor electrice diferite pe care le poartă ca și a altor parametrii fizico-

Scanned with OKEN Scanner

chimici (formă, greutate, densitate de sarcină), în cîmpuri electrice, fracţiunile lipoproteice au mobilităţi diferite care permit separarea lor. Electroforeza se poate practica atît pe hîrtie, cît şi pe alte suporturi solide. În electroforeza pe hîrtie poziţiile lipoproteinelor sînt vizualizate prin colorarea lor cu un compus cu afinitate pentru lipide (negru de Sudan). Prin decuparea spoturilor colorate, eluarea colorantului şi măsurarea densităţii optice a fiecărui eluat se pot stabili proporţiile relative ale diverselor fracţiuni lipoproteice din ser. În principiu, prin această metodă se pot obţine patru fracţiuni (fig. X.11). Chilomicronii care nu au sarcină electrică nu migrează într-un cîmp electric şi vor fi regăsiţi la linia de start. Celelalte trei fracţiuni sînt α-lipoproteinele cu mobilitatea cea mai mare, β-lipoproteinele cu mobilitatea cea mai mică. Puţin înaintea β-lipoproteinelor se află fracţiunea denumită pre-β-lipoproteine. Este necesar să fie subliniat că electroforeza nu ordonează lipoproteinele în raport cu densităţile lor. β-Lipoproteinele corespund fracţiunii lipoproteice cu densitate mică, pre-β-lipoproteinele corespund lipoproteinelor cu densitate foarte mică, iar α-lipoproteinele sînt lipoproteine cu densitate mare. La un om sănătos à jeun, chilomicronii sînt absenţi iar pre-β-lipoproteinele sînt foarte slab reprezentate. Persistenţa acestora în sînge după o noapte de foame este un indicator al unor tulburări metabolice.

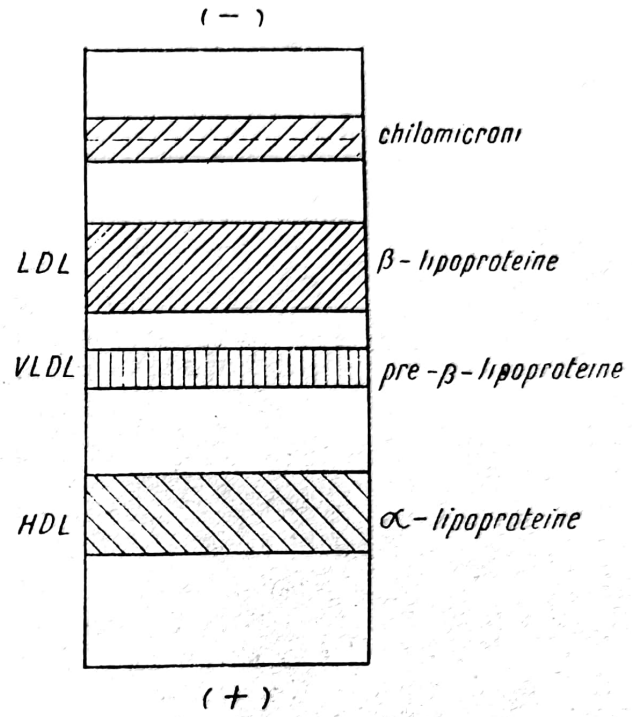


Fig. X.11. Distribuţia lipoproteinelor serice la electroforeză.

Separarea lipoproteinelor prin metoda ultracentrifugării necesită o aparatură costisitoare şi nu poate fi practicată decît în laboratoare de cercetare. În schimb, separarea electroforetică a lipoproteinelor serice (efectuarea lipidogramei) este o metodă curentă de investigaţie clinică şi în asociere cu determinările chimice ale lipidelor plasmatice permite stabilirea dismetabolilor lipidice.

4.2. SURSELE ŞI CĂILE DE UTILIZARE A LIPIDELOR SANGUINE

4.2.1. CHILOMICRONII

Reprezintă o populaţie heterogenă de particule de emulsie cu diametre cuprinse între 1 000 şi 5 000 Å. Refractă lumina şi conferă plasmei un aspect lactescent. Reprezintă o emulsie de trigliceride stabilizată de proteine, fosfolipide şi colesterol. Au un conţinut ridicat în lipide (99%) şi dintre acestea trigliceridele sînt preponderente (88% din totalul lipidelor).

Chilomicronii se formează în celulele mucoasei intestinale din trigliceridele alimentare. Proteinele din chilomicroni sînt sintetizate în mucoasa intestinală sau sînt de origine hepatică. Din enterocite chilomicronii pătrund în vasele limfatice, ajung în canalul toracic şi de aici trec în circulaţia sistemică. Chilomicronii reprezintă forma de transport a trigliceridelor alimentare de la nivelul intestinului spre ţesuturi. Concentraţia chilomicronilor înainte de masă este mică sau zero şi creşte după ingerarea unei mese cuprinzînd grăsimi. În fig. X.12 se arată intensitatea răspunsului lipemic (creşterea trigliceridemiei după ingestia de grăsimi) şi durata acestui răspuns la persoanele sănătoase. După aproximativ 9 ore de la masă chilomicronii dispar din sînge, plasma se clarifică. Un răspuns lipemic mai pronunţat şi persistenţa lui mai îndelungată este un indiciu al scăderii vitezei de epurare a sîngelui de chilomicroni şi se întîlneşte în general la persoanele obeze şi cu predispoziţie la ateroscleroză.

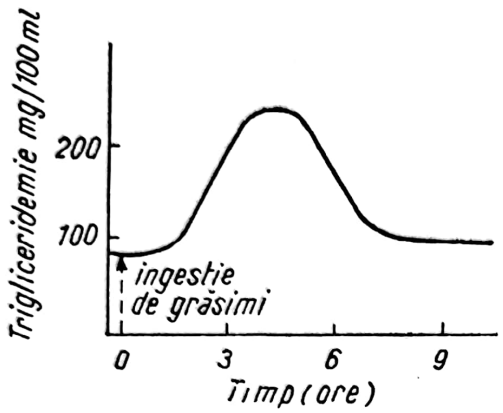


Fig. X.12. Răspunsul lipemic la un adult normal.

În mod normal viaţa medie a chilomicronilor este foarte scurtă, sîngele este epurat rapid de chilomicroni. Chilomicronii sînt particule cu dimensiuni mari şi ei nu pot trece prin membranele celulare. Ei sînt metabolizaţi prin hidroliza trigliceridelor componente şi difuzia produşilor de hidroliză, glicerolul şi acizii graşi, în interiorul celulelor. Enzima care catalizează hidroliza trigliceridelor din chilomicroni poartă denumirea de lipoprotein-lipază. Această enzimă este localizată în celulele endoteliale ale capilarelor şi acţionează pe suprafaţa lor luminală. Sub acţiunea acestei enzime trigliceridele din chilomicroni sînt hidrolizate, mai întîi la digliceride ca apoi reacţia să continue la monogliceride şi glicerol. Glicerolul şi acizii graşi trec în celule în cea mai mare parte, numai o fracţiune foarte redusă rămînînd în plasmă şi adăugîndu-se fondului de acizi graşi liberi. Ceilalţi componenţi ai chilomicronilor, proteine, colesterol, fosfolipide (reziduul chilomicronic), se asociază cu alte fracţiuni lipoproteice şi sînt catabolizate în ficat. Componenta proteică a chilomicronilor, după hidroliza trigliceridelor, este regăsită parţial în lipoproteinele cu densitate mare.

Capacitatea unui ţesut de a utiliza trigliceridele din chilomicroni depinde de activitatea lipoproteino-lipazei. Ţesuturile consumatoare de chilomicroni sînt ţesutul adipos, muşchii scheletici, miocardul, plămînii, rinichiul, glanda mamară în lactaţie. Creierul nu dispune de lipoprotein-lipază şi nu poate utiliza chilomicroni. Ficatul nu are nici el o lipoprotein-lipază activă dar s-a stabilit că în ficat chilomicronii pot pătrunde ca particule intacte în spaţiile intercelulare Disse şi de aici sînt eliberaţi din nou în circulaţie. Activitatea lipoprotein-lipazei din ţesutul adipos fluctuează în raport cu factori nutriţionali şi hormonali. Activitatea enzimei este ridicată în perioadele de alimentare, ceea ce permite o epurare rapidă a sîngelui de chilomicroni şi depozitarea trigliceridelor în ţesutul adipos. Activitatea lipoprotein-lipazei în glanda ma-

Scanned with OKEN Scanner

mară suferă variaţii puternice în funcţie de starea funcţională a acestui ţesut. Numai în perioadele de lactaţie enzima este activă şi ţesutul utilizează trigliceride din chilomicroni.

4.2.2. LIPOPROTEINELE CU DENSITATE FOARTE MICĂ (VLDL PRE-β-LIPOPROTEINE)

Această clasă cuprinde lipoproteinele cu densităţi mai mici de 1,006 g/cm^3. Cuprinde o populaţie de particule cu diametre între 30 şi 90 nm, situate la limita dintre o adevărată emulsie şi microemulsie. Nu difuzează lumina şi soluţiile care le cuprind sînt clare. Au un conţinut lipidic ridicat (93%) dintre care 50—60% sînt trigliceride, restul fosfolipide (20%), colesterol liber (15%) şi esterificat (8%).

Lipoproteinele cu densitate foarte mică sînt sintetizate în ficat şi reprezintă forma de transport a trigliceridelor sintetizate în acest organ spre ţesuturile extrahepatice. Cantităţi mici din aceste lipoproteine se formează şi în celulele intestinale. Celelalte componente ale acestei fracţiuni lipoproteice sînt sintetizate în ficat şi transportul trigliceridelor de la ficat în restul organismului va fi condiţionat de disponibilităţile sale în aceste componente. Materialele din care sînt obţinute trigliceridele hepatice sînt acizii graşi extraşi din plasmă din fracţiunea „acizi graşi liberi" sau sînt obţinuţi in situ prin sinteza lor din glucoza excedentară. Glicerolul este obţinut fie din glucoză (via secvenţa Embden-Meyerhof) fie este captat din plasmă. Ţinînd seama de cele două surse de acizi graşi rezultă că sinteza hepatică de trigliceride şi producţia de lipoproteine cu densitate foarte mică sînt crescute după ingerarea unor mese bogate în glucide sau atunci cînd este ridicat nivelul plasmatic al acizilor graşi liberi (în foame, în diabet). Prin urmare trigliceridemia (concentraţia plasmatică a trigliceridelor) creşte după ingerarea unui prînz mixt, alcătuit atît din grăsimi cît şi din glucide, pe de o parte, pe seama chilomicronilor (care transportă trigliceridele alimentare) şi pe de altă parte, pe seama lipoproteinelor cu densitate foarte mică (care transportă trigliceridemia obţinute din glucidele în exces).

Epurarea sîngelui de lipoproteinele cu densitate foarte mică se face în aceleaşi condiţii ca şi a chilomicronilor. Sub acţiunea lipoprotein-lipazelor tisulare trigliceridele sînt hidrolizate şi glicerolul şi acizii graşi pătrund în celule. Lipoproteinele cu densitate foarte mică debarasate de încărcătura lor de trigliceride devin fracţiunea lipoproteine cu densitate mică. Unele din componentele proteice ale lipoproteinelor cu densitate foarte mică sînt cuprinse însă şi în fracţiunea cu densitate mare.

4.2.3. LIPOPROTEINELE CU DENSITATE MICĂ (LDL, β-LIPOPROTEINE)

Această fracţiune este alcătuită din particule sferice cu diametrul cuprins între 20 şi 29 nm. Au un conţinut destul de ridicat în lipide (84%) dintre care 50% este colesterol. Aceste lipoproteine cuprind cantitatea cea mai mare de colesterol (50% din conţinutul lipidic) care se află în cea mai mare parte esterificat. Alte substanţe lipidice, carotenii, vitaminele liposolubile A şi E, sînt cuprinse în această fracţiune. Rolul lipoproteinelor cu densitate mică este transportul trigliceridelor de la ficat la ţesuturile extrahepatice. Lipoproteinele cu densitate mică după încărcarea lor cu trigliceride devin lipoproteinele cu densitate foarte mică. Metabolismul acestei fracţiuni este puţin cunoscut.

Scanned with OKEN Scanner

4.2.4. LIPOPROTEINELE CU DENSITATE MARE (HDL, â-LIPOPROTEINE)

Au un conţinut proteic ridicat (45%) şi constituie fracţiunea lipoproteică cu densitatea cea mai mare. Au un conţinut destul de ridicat în colesterol esterificat (30% din totalul lipidelor). Fracţiunea lipidică cea mai abundentă este însă reprezentată de fosfolipide (45%). Unele componente proteice din aceste lipoproteine sînt cuprinse în celelalte fracţiuni.

4.2.5. ACIZII GRAŞI LIBERI (ACIZI GRAŞI NEESTERIFICAŢI)

O componentă lipidică a plasmei este reprezentată de acizi graşi. Acestei fracţiuni i se spune acizi graşi liberi (AGL) în opoziţie cu acizii graşi legaţi esteric în trigliceride şi alte lipide. Această fracţiune mai este denumită NEFA (non esterified fatty acids) sau FFA (free fatty acids). Acizii graşi sînt greu solubili în apă şi de fapt ei nu sînt liberi în plasmă ci sînt legaţi de albumine prin interacţiuni fizice. Prin această legare solubilitatea în apă a acizilor graşi creşte considerabil (de cca 1 000 de ori). O moleculă de albumină poate lega 7 molecule de acid gras în situsuri specifice. În mod normal capacitatea albuminelor de legare a acizilor graşi nu este saturată. Concentraţia plasmatică a acizilor graşi liberi la un om sănătos este de 40—50 mEq/100 ml.

Sursa principală a acizilor graşi liberi este hidroliza trigliceridelor în ţesutul adipos, reacţie prin care depòzitele de grăsimi ale acestui ţesut furnizează substrate energetice pentru restul organismului. Depozitele de trigliceride din alte ţesuturi nu contribuie la fondul de acizi graşi liberi, deoarece ele nu exportă din rezervele lor energetice. Factorii care determină intensitatea hidrolizei trigliceridelor din ţesutul adipos (lipoliza) şi efluxul de acizi graşi vor fi examinaţi la metabolismul ţesutului adipos. O a doua sursă de acizi graşi liberi plasmatici o constituie trigliceridele din chilomicroni şi lipoproteine cu densitate foarte mică, care sub acţiunea lipoprotein-lipazei pun în libertate acizi graşi. Totuşi, importanţa acestei căi de intrare a acizilor graşi liberi în plasmă este nesemnificativă în raport cu adipoliza.

Acizii graşi plasmatici sînt captaţi de către ţesuturi şi utilizaţi intracelular. Cu excepţia creierului şi hematiilor, toate celelalte ţesuturi au capacitatea de a utiliza acizi graşi liberi ca substrat energetic. Mai mult decît atît, muşchii scheletici, inima, rinichiul în anume condiţii, ard acizii graşi în mod preferenţial faţă de glucoză. Ficatul este şi el un organ cu o capacitate mare de captare a acizilor graşi liberi din plasmă şi particularităţile lor de utilizare vor fi examinate mai departe.

5. ROLURILE ŢESUTULUI ADIPOS ŞI ALE FICATULUI ÎN MOBILIZAREA, TRANSPORTUL ŞI UTILIZAREA LIPIDELOR

Grăsimile sînt utilizate ca materiale energetice de majoritatea ţesuturilor. Mai mult decît atît, pentru miocard, muşchi scheletici, rinichi, acizii graşi sînt arşi în mod preferenţial. Ficatul şi ţesutul adipos îndeplinesc însă funcţii speciale în stocarea rezervelor energetice sub forma de grăsimi şi punerea lor în circulaţie în momentele de necesitate.

Scanned with OKEN Scanner

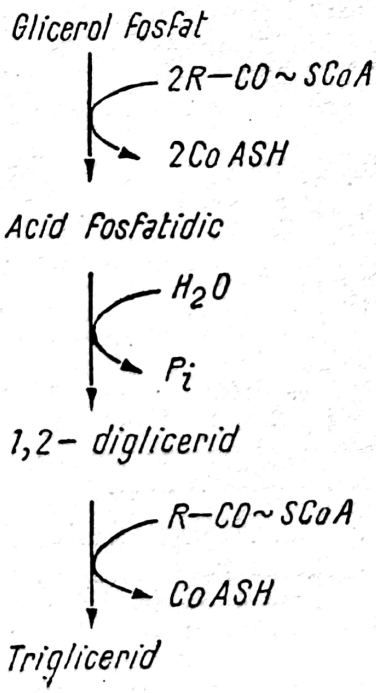
5.1. ŢESUTUL ADIPOS

Acest ţesut este o varietate de ţesut mezenchimatos cu o repartizare predominant subcutană şi perivisceralã. Este alcătuit din aglomerări de celule grase (adipocite) înconjurate de o bogată reţea vasculară şi nervoasă. Funcţia principală a adipocitelor este depozitarea trigliceridelor cînd organismul dispune de un excedent de materiale energetice, pentru ca în momentele de privaţiuni calorice prin dislocarea acestor componenţi să se ofere organismului acizi graşi ca substrate energogene.

Trigliceridele din ţesutul adipos nu sînt un material inert, care suferă doar variaţii cantitative. Ele se află într-o permanentă reînnoire chiar atunci cînd depozitul de grăsimi din ţesutul adipos este invariabil perioade mai lungi. Dislocarea trigliceridelor are loc prin hidroliză pînă la glicerol şi la acizi graşi — lipoliză sau adipoliză. Procesul invers, sinteza trigliceridelor, se numeşte lipogeneză sau adipogeneză.

5.1.1. LIPOGENEZA

Sinteza trigliceridelor în ţesutul adipos are loc pe calea glicerol-fosfatului:



În ţesutul adipos glicerol-fosfatul se obţine din glucoză, via secvenţa Embden-Meyerhof, prin reducerea dihidroxiacetono-fosfatului. Adipocitele nu cuprind enzima glicerol kinază, care fosforilează glicerolul, ceea ce face imposibilă utilizarea metabolică a glicerolului. Acest fapt are importanţă deosebită, întrucît sinteza trigliceridelor în ţesutul adipos devine dependentă de concentraţia plasmatică a glucozei şi a insulinei, hormon care mediază trecerea glucozei în adipocite.

Acizii graşi care sînt încorporaţi în trigliceridele din adipocite au următoarele provenienţe:

a) Acizii graşi din grăsimile alimentare. O moleculă de acid gras din trigliceridele ingerate este depozitată ca trigliceride în ţesutul adipos parcurgînd un şir de transformări care sînt arătate în fig. X.13.

Scanned with OKEN Scanner

b) Acizii graşi sintetizaţi în ficat din surplusul de glucoză. Se evaluează că aproximativ o treime din glucidele cuprinse într-o raţie obişnuită, mixtă, sînt convertite în acizi graşi în ficat. Acizii graşi obţinuţi în acest fel sînt

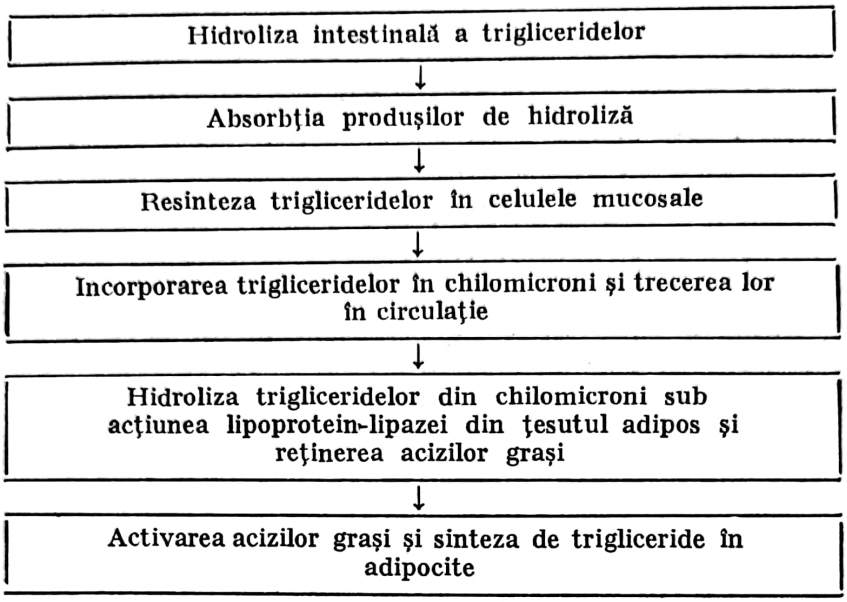


Fig. X.13. Circuitul acizilor graşi din intestin pînă la ţesutul adipos.

transportaţi în ţesutul adipos, în vederea depozitării lor, sub formă de trigliceride încorporate în pre-β-lipoproteine (lipoproteine cu densitate foarte mică) — fig. X.14.

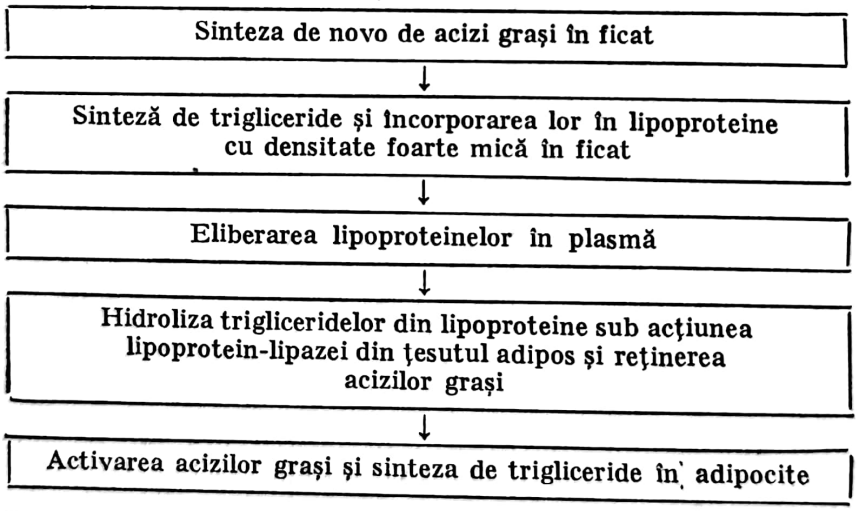


Fig. X.14. Circuitul acizilor graşi, sintetizaţi în ficat din glucoză, pînă la ţesutul adipos.

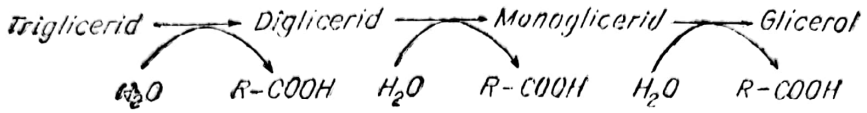
c) Acizii graşi sintetizaţi de novo în ţesutul adipos pornindu-se de la glucoză. Această cale nu are o însemnătate deosebită la om.

Lipogeneza este favorizată de un aport caloric excesiv, atît sub formă de lipide cît şi ca glucide. În perioadele de alimentare activitatea lipoprotein-lipazei din ţesutul adipos este crescută, ceea ce permite utilizarea trigliceridelor şi influxul de acizi graşi în ţesutul adipos. Hiperglicemia postprandială şi hiperinsulinemia favorizează obţinerea glicerol-fosfatului.

Scanned with OKEN Scanner

5.1.2. LIPOLIZA

Hidroliza trigliceridelor în țesutul adipos are loc secvențial:



Prima etapă, catalizată de trigliceric-lipază denumită și lipaza hormon-sensibilă întrucît este activată de catecolamine și de glucagon, este reacția limitantă de viteză. Produșii de hidroliză pot suferi următoarele transformări:

Glicerolul nu poate fi metabolizat pe nici o cale metabolică deoarece țesutul adipos nu este dotat cu glicerol kinază și fosforilarea este o etapă obligatorie pentru utilizarea metabolică a glicerolului. Glicerolul este eliberat în plasmă de unde este captat de ficat. Cantitatea de glicerol care trece în plasmă este o măsură a vitezei de hidroliză a trigliceridelor din țesutul adipos.

Acizii grași rezultați prin lipoliză pot fi utilizați:

a) O fracțiune, în general destul de mică, este arsă pentru a furniza energie metabolică țesutului adipos.

b) Acizii grași pot fi reactivați la derivați acil-CoA și reîncorporați in situ, în trigliceride. Acest proces este dependent de ritmul pătrunderii glucozei în adipocite care furnizează glicerol-fosfat. Dacă lipoliza și lipogeneza au loc cu viteze egale, cantitatea de gliceride nu variază, singurul indicator al lipolizei este glicerolul eliberat în plasmă.

c) O a treia modalitate de a dispune de acizii grași produși prin lipoliză este trecerea lor în circulație constituind fracțiunea plasmatică „acizi grași liberi".

Lipoliza cu trecerea acizilor grași în plasmă reprezintă calea prin care organismul mobilizează rezervele de grăsimi pentru a face față cerințelor de materiale energetice. În intervalele obișnuite dintre mese lipoliza, urmată de creșterea nivelului plasmatic al acizilor grași liberi, furnizează combustibil pentru mușchi, rinichi, miocard și alte țesuturi. Glicemia mai scăzută menține insulinemia la o concentrație la care țesutul adipos nu poate utiliza glucoza suficient de bine. În aceste condiții disponibilitățile de glicerol-fosfat sînt limitate, lipoliza întrece lipogeneza, acizii grași sînt eliberați în plasmă de unde sînt preluați de țesuturi și arși.

După un post prelungit, în inaniție, deficiența de glucoză și hipoinsulinemia exacerbează lipoliza și organismul este invadat cu acizi grași liberi. Ficatul are sarcina de a epura plasma de acești compuși transformîndu-i în trigliceride dar mai ales în corpi cetonici.

Lipoliza este o reacție de adaptare a organismului pentru a face față unor nevoi crescute de substrate energetice: exerciții fizice intense, situații stresante — frig, emoții etc. Organismul dispune de sisteme de reglare care activează lipoliza și dirijează acizii grași spre țesutul muscular, iar glucoza este economisită pentru uzul sistemului nervos. Prin stimulare nervoasă simpatică se eliberează în circulație adrenalină (în special din medulo-suprarenale) și noradrenalină (în special, din terminațiile nervoase adrenergice). Acești hormoni activează trigliceric-lipaza țesutului adipos și lipoliza este accelerată. Totodată scăderea insulinei (cauzată tot de catecolamine) dimi-

Scanned with OKEN Scanner

nuează tranzitul glucozei în țesutul adipos și în lipsă de glicerol-fosfat, acizii grași trec în sînge.

Lipoliza excesivă asociată cu niveluri ridicate de acizi grași liberi este o tulburare metabolică a diabetului, maladie determinată de insuficiența insulinică. Absența insulinei în sînge (ca urmare a unor deficiențe funcționale ale pancreasului endocrin) sau scăderea sensibilității țesuturilor dependente la insulină, prin limitarea cantității de glicerol-fosfat în adipocite, determină lipoliză crescută și creșterea concentrației acizilor grași liberi.

5.2. FICATUL

Ficatul nu este un organ de depozitare a trigliceridelor de rezervă dar el joacă un rol important la stocarea acestor materiale în țesutul adipos. În ficat, surplusul de glucide alimentare este transformat în grăsimi, ca apoi acestea să fie transportate spre țesuturile extrahepatice spre a fi utilizate imediat, iar ceea ce prisosește este depozitat în țesutul adipos.

Ficatul deține un rol important în captarea din plasmă a acizilor grași liberi. Aproximativ o treime din acizii grași liberi sînt reținuți în ficat, independent de concentrația lor plasmatică. La niveluri joase pătrund în ficat cantități moderate de acizi grași, care sînt distribuiți pe diverse căi metabolice. La concentrații ridicate de acizi grași liberi ficatul este însă invadat de acești compuși de care urmează să se debaraseze. Căile principale de utilizare a acizilor grași în ficat sînt:

a) Degradarea oxidativă pentru mobilizarea de energie; cantitățile de acizi grași care pot fi arse sînt însă limitate de nevoile de ATP, de energie metabolică.

b) Încorporarea acizilor grași în trigliceride și exportul lor ca lipoproteine cu densitate foarte mică spre țesuturile extrahepatice.

c) O altă cale de utilizare hepatică a acizilor grași este conversia lor în așa-zișii corpi cetonici (cetogeneză).

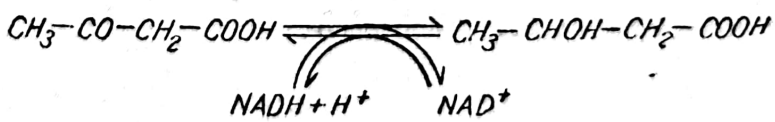
Cetogeneza. Prin „corpi cetonici" se înțeleg următorii compuși:

acidul acetoacetic: $CH_3-CO-CH_2-COOH$

acidul β-hidroxibutiric: $CH_3-CHOH-CH_2-COOH$

acetona: $CH_2-CO-CH_3$

Acidul acetoacetic este compusul primar din care se formează ceilalți doi corpi cetonici. Acidul β-hidroxibutiric rezultă prin hidrogenare enzimatică, reacție care este ușor reversibilă:



Acetona rezultă prin decarboxilarea, neenzimatică, a acidului acetoacetic, atunci cînd concentrațiile acestuia din urmă sînt mari.

Acidul acetoacetic sub formă de derivat acil-CoA ($CH_3-CO-CH_2-CO\sim SCoA$) este un intermediar al β-oxidării tuturor acizilor grași (este penultimul derivat β-cetoacil-CoA al spiralei Lynen). Numai acidul liber, neactivat, este însă „corp cetonic".

Scanned with OKEN Scanner

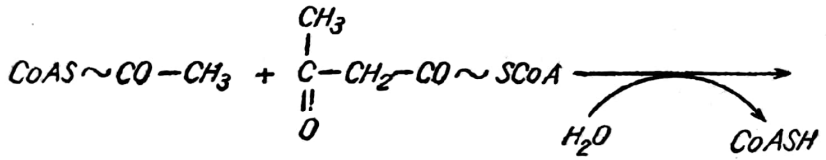
În principiu acidul acetoacetic s-ar putea forma prin dezactivarea acetoacetil-CoA rezultat prin β-oxidarea incompletă a oricărui acid gras. Chiar dacă această reacție are loc ea nu explică decît formarea unor cantități mici de acid acetoacetic. Materia primă pentru sinteza corpilor cetonici este de fapt acetil-CoA produsul β-oxidării complete a acizilor grași, astfel încît toți atomii de carbon ai unei molecule de acid gras pot fi convertiți în acid acetoacetic.

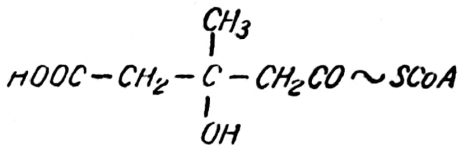
Sinteza de acid acetoacetic are loc astfel:

a) Condensarea a două molecule de acetil-CoA la acetoacetil-CoA:

$$CH_3-CO\sim SCoA + CH_3-CO\sim SCoA \rightarrow CH_3-CO-CH_2-CO\sim SCoA$$
$$\searrow CoASH$$

b) Condensarea unei a treia molecule de acetil-CoA cu acetoacetil-CoA dînd naștere la un compus cu șase atomi de carbon, β-hidroxi-β-metil-glutaril-CoA (HMG—CoA):





HMG - CoA

Din β-hidroxi-β-metil-glutaril-CoA, printr-o reacție inversă condensării aldolice se formează acidul acetoacetic:

$$HOOC-CH_2-\underset{\displaystyle CH_3}{\overset{\displaystyle OH}{\overset{|}{\underset{|}{C}}}}-CH_2CO\sim SCoA \rightarrow CH_3-CO\sim SCoA + CH_3-CO-CH_2-COOH$$

Trebuie menționat că hidroxilmetil-glutaril-CoA este totodată și precursor al colesterolului.

Ficatul nu este apt pentru a metaboliza mai departe acidul acetoacetic întrucît el nu are capacitatea de a-l activa la acetoacetil-CoA, formă obligatorie pentru reacțiile β-oxidării. Acidul acetoacetic din ficat trece în sînge de unde este luat de către țesuturile extrahepatice și după activare este degradat oxidativ. Acidul β-hidroxibutiric urmează și el aceeași cale: dehidrogenare, oxidativ. Acidul β-hidroxibutiric urmează și el aceeași cale: dehidrogenare, activare și β-oxidare. Mușchii scheletici și miocardul utilizează corpii cetonici ca substrate energetice cu o viteză foarte mare; sînt preferați chiar în locul glucozei și al acizilor grași.

În condiții obișnuite cetogeneza are loc cu o viteză mică și corpii cetonici sînt utilizați de către țesuturile extrahepatice în același ritm astfel încît cetonemia este foarte scăzută (1 mg/100 ml).

Celoza. Cînd ficatul sintetizează cantități foarte mari de acid acetoacetic cetonemia crește pînă la niveluri la care capacitatea țesuturilor extrahepa-

tice de a arde corpii cetonici este depășită (la aproximativ 70 mg/100 ml plasmă) și se ajunge la hipercetonemie. Această situație — în care organismul este invadat de corpi cetonici, caracterizată prin hipercetonemie și cetonurie este cunoscută sub numele de „cetoză".

Ținîndu-se seama că acidul acetoacetic este sintetizat din acetil-CoA (provenită din β-oxidarea acizilor grași) rezultă că ritmul cetogenezei depinde de influxul de acizi grași liberi în ficat. Cînd ficatul este invadat cu acizi grași, cetogeneza devine o modalitate de a dispune de surplusul de acizi grași. Inaniția prelungită și insuficiența insulinică, care provoacă în țesutul adipos un dezechilibru între lipoliză și lipogeneză și creșterea consecutivă a concentrației acizilor grași liberi în plasmă, sînt asociate totdeauna cu hipercetonemii și cetonurii de diverse intensități. Acidoza și deshidratarea care întovărășesc starea de „cetoză", provoacă coma diabetică.

Ficatul gras. Prin ficat gras, steatoza sau infiltrația grăsoasă a ficatului, se înțelege acumularea de trigliceride în ficat. Această tulburare este rezultatul unei sinteze hepatice intense de trigliceride sau al unei dereglări a mecanismului de export al grăsimilor din ficat.

Cînd nivelul plasmatic al acizilor grași liberi este ridicat, o cantitate mare de acizi grași trece prin ficat care îi încorporează, în parte, în trigliceride pentru a le trimite din nou în circulație sub formă de lipoproteine cu densitate foarte mică. Dacă influxul de acizi grași este continuu și ridicat, cantitățile mari de trigliceride nu pot fi incorporate în lipoproteine în ritmul în care sînt sintetizate, ceilalți componenți ai lipoproteinelor devenind factorii limitanți pentru exportul trigliceridelor.

În alte situații acumularea de grăsimi în ficat, nu este rezultatul unei sinteze excesive de trigliceride, ci al incapacității ficatului de a furniza proteinele fosfolipidele sau alți componenți ai lipoproteinelor. Inhibiția sintezei proteice cu diverse toxice determină ficat gras. Antibioticul tetraciclină administrat nerațional prin blocarea sintezei proteinelor, duce la acumulare de grăsimi în ficat. Experimental s-a produs ficat gras la animale de laborator prin hrănirea lor cu rații lipsite de colină, componentă a fosfolipidelor. La om colina și precursorul ei metionina au efecte lipotrope, favorizînd transportul trigliceridelor din ficat. Acizii grași polietilenici (acidul linoleic) constituenți specifici ai lecitinelor exercită și ei efecte lipotrope.

6. METABOLISMUL COLESTEROLULUI

Colesterolul îndeplinește în organism următoarele funcții:

a) În stare liberă sau sub formă de esteri participă la edificarea structurilor lipoproteice celulare și a lipoproteinelor solubile din plasmă. Creierul și și în special substanța nervoasă albă este foarte bogată în colesterol. Spre deosebire de alte țesuturi care cuprind în special esteri ai colesterolului, în substanța nervoasă se află numai colesterol liber. Conținutul în colesterol al creierului și al nervilor crește în perioada de mielinizare după care rămîne aproape constant în tot restul vieții. Pe de altă parte, colesterolul din substanță nervoasă are o mare stabilitate metabolică, el nu se reînnoiește prin degradare și sinteză și nu se schimbă cu colesterolul din celelalte compartimente ale organismului.

Scanned with OKEN Scanner

După sistemul nervos ficatul este al doilea ţesut în ceea ce priveşte conţinutul total în colesterol şi acesta se află în cea mai mare parte esterificat. Colesterolul hepatic, spre deosebire de cel cuprins în creier şi nervi are o activitate metabolică foarte ridicată. Cortexul adrenalelor cuprinde cea mai mare cantitate de colesterol raportată la gram de ţesut, aceste glande fiind sediul unei sinteze active de hormoni steroidici.

Lipoproteinele plasmatice cuprind colesterol, liber sau esterificat, în proporţii variabile (a se vedea tabelul X.4). În aceste agregate supramoleculare colesterolul este o componentă structurală importantă dar în acelaşi timp lipoproteinele plasmatice reprezintă modul de transport al colesterolului în cadrul circulaţiei sale între diverse compartimente, ficat, intestin şi alte ţesuturi extrahepatice.

b) O altă funcţie a colesterolului este aceea de a fi precursorul hormonilor steroidici, hormonii corticosuprarenali şi gonadici.

c) Colesterolul este materia primă pentru sinteza acizilor biliari.

d) Din colesterol se sintetizează în organism vitamian D_3 (colecalciferolul).

6.1. DIGESTIA, ABSORBŢIA ŞI TRANSPORTUL COLESTEROLULUI

Colesterolul din organism provine atît din alimente cît şi prin sinteză endogenă. Raţia obişnuită a unui adult cuprinde între 600 şi 1200 g/zi colesterol liber plus esteri cu acizi graşi. Alimentele cele mai bogate în colesterol sînt creierul, ouăle, ficatul.

La nivelul intestinului colesterolul liber şi cel esterificat este solubilizat prin încorporarea sa în picăturile de emulsie şi în agregatele micelare. Din acestea din urmă colesterolul liber este absorbit, trecînd în celulele mucoasei intestinale. Esterii suferă mai întîi acţiunea hidrolitică a colesterol esterazei. Enzima este cuprinsă în sucul pancreatic şi devine catalitic activă în lumenul intestinal cînd ajunge în contact cu acizii biliari care îi demască centrul activ. Produşii de hidroliză înglobaţi în micelii difuzează apoi în enterocite. Alături de colesterolul din alimente în intestin se mai află colesterolul cuprins în bilă şi acela provenit din celulele mucoasei descuamate. Colesterolul exogen se amestecă cu cel de origine endogenă, urmînd aceleaşi transformări. Capacitatea mucoasei intestinale de a absorbi colesterol este limitată şi de aceea numai o fracţiune din colesterolul alimentar este absorbit. Colesterolul din bilă găsindu-se în fază micelară, împreună cu acizii biliari şi cu fosfolipide, este mai uşor absorbabil decît cel exogen. Din această cauză proporţia din colesterol exogen absorbită este cu atît mai mare, cu cît raţia cuprinde mai puţin colesterol. La un aport exogen de aproximativ 600 mg colesterol pe zi absorbţia este de 150—175 mg/zi.

Colesterolul este în majoritate esterificat în celulele mucoasei intestinale şi împreună cu colesterolul liber este încorporat în chilomicroni şi deversat în vasele limfatice ajungînd, via canalul toracic, în plasmă. Colesterolul din chilomicroni este reţinut de către ţesuturi, în special de ficat. Deoarece numai colesterolul liber poate trece în membranele celulare, esterii colestero-

Scanned with OKEN Scanner

lului cuprinşi în chilomicroni sînt hidrolizaţi de o colesterol esterază tisulară. Nu se cunosc amănunte în legătură cu acest proces, dar este probabil asociat cu debarasarea chilomicronilor de încărcătura lor de trigliceride.

6.2. COLESTEROLUL PLASMATIC

Colesterolul, liber sau sub formă de esteri, se află în plasmă în diversele fracţiuni lipoproteice, chilomicroni, lipoproteine cu densitate foarte mică (pre-β-lilipoproteine), cu densitate mică (β-lipoproteine) şi cu densitate mare (α-lipoproteine). Chilomicronii şi pre- β-lipoproteinele se află în plasmă în concentraţii apreciabile doar în perioadele ce urmează ingerării de alimente, atingînd maximul la 3—4 ore de la masă. Plasma este epurată destul de rapid de aceste fracţiuni, astfel că după cca. 10 ore de post, plasma nu mai cuprinde chilomicroni iar pre-β-lipoproteinele se află doar în urme. În aceste condiţii colesterolul este prezent în principal în β-lipoproteine şi în α-lipoproteine, prima dintre acestea fiind fracţiunea mai bogată în colesterol. Concentraţia plasmatică a colesterolului, dimineaţa înainte de masă (à jeun) este pentru adult 150—220 mg/100 ml din care aproximativ 65% este esterificat. La copii (0—13 ani) valorile sînt mai mici (tabelul X.5).

Tabelul X. 5

Colesterolemia la adulţi şi copii în funcţie de vîrstă*

	Numărul cazurilor	Colesterol total mg/100 ml ser (valori medii)	Colesterol liber mg/100 ml ser (valori medii)
Adult 20—35 ani	62	178	46
Adult 45—70 ani	30	209	61
Copil 3—10 zile	15	134	49
Copil 1—12 luni	37	130	40
Copil 2—14 ani	25	188	54
Copil 10—13 ani	635	154	—

*după Tables Scientifiques CIBA — GEIGY — 1972.

Colesterolul liber cuprins în lipoproteinele plasmatice este interschimbabil cu colesterolul liber tisular, exceptînd ţesutul nervos. În schimb, esterii colesterolului nu pot trece din plasmă în ţesuturi şi viceversa, astfel încît esterii colesterolului reprezintă o formă de depozitare a acestui compus. Existenţa colesterolului plasmatic mai ales sub formă de esteri nedifuzibili poate fi considerată ca un mijloc de apărare împotriva depozitării colesterolului în ţesuturi.

Esterii plasmatici şi tisulari ai colesterolului sînt sintetizaţi ad hoc prin mecanisme distincte. În ţesuturi acţionează enzime (colesterol-ester sintetaze) care transferă resturi acil din derivaţii acil-CoA pe colesterol:

$$R-CO\sim SCoA + \text{colesterol} \rightarrow \text{acil-colesterol} + CoASH$$

Acizii graşi cei mai răspîndiţi în esterii tisulari ai colesterolului, sînt acidul oleic, palmitic şi palmitoleic.

Scanned with OKEN Scanner

Esterii colesterolului din β şi α-lipoproteinele plasmatice sînt sintetizaţi, în cea mai mare parte chiar în plasmă prin transferul de resturi acil din fosfatidil-coline (lecitine) pe colesterol:

lecitină (fosfatidil—colină) + colesterol → acil-colesterol + lisolecitină (lisofosfatidil-colină)

Enzima care catalizează această reacţie, denumită lecitină → colesterol acil transferază (LCAT), prezintă specificitate pentru grupul acil din poziţia 2 a lecitinei, ceea ce explică preponderenţa acidului linoleic în esterii colesterolului plasmatic. Prin esterificare colesterolul din lipoproteine este temporar imobilizat, prevenindu-se în acet fel trecerea rapidă şi necontrolată a colesterolului din plasmă în ţesuturi. La persoanele la care enzima LCAT este absentă sau deficitară (datorită probabil unor tulburări genetice) raportul colesterol total/colesterol esterificat creşte prin scăderea numitorului. Totodată la aceşti subiecţi au loc depuneri de colesterol în ţesuturi, în pereţii vaselor.

Colesterolul plasmatic cuprins în fracţiunea lipoproteică cu densitate mică (β-lipoproteine sau low density lipoporteins, LDL) este sursa de colesterol pentru majoritatea ţesuturilor extrahepatice care nu sintetizează endogen colesterol. Mecanismul de transfer al colesterolului din lipoproteinele plasmatice în interiorul celulelor a fost descris de Goldstein şi Brown (1976) sub denumirea de „calea β-lipoproteinelor" (calea LDL). Această cale constituie totodată şi un mecanism de reglare a captării, depozitării şi sintezei de colesterol, prevenind supraacumularea sa intracelulară.

Calea „β-lipoproteinelor" cuprinde mai multe etape:

a) β-Lipoproteinele plasmatice sînt fixate pe suprafaţa celulelor prin receptori proteici cu o înaltă specificitate pentru aceste lipoproteine. Interacţiunea β-lipoproteină — receptor necesită un cation bivalent de Ca^{2+} (sau de Mn^{2+}). Numărul de receptori la un anumit tip de celulă este variabil fiind reglat printr-un mecanism feedback de concentraţia β-lipoproteinelor în mediul extracelular.

b) Lipoproteinele fixate pe receptori sînt translocate în interiorul celulei, după care particulele lipoproteice fuzionează cu lisosomii.

c) În interiorul lisosomilor componentele lipoproteinei — proteine, fosfolipide, esteri ai colesterolului, trigliceride — sînt supuse acţiunii hidrolazelor lisosomale, peptidaze, lipaze, colesterol esteraze. Colesterolul liber este utilizat pentru construcţia structurilor membranare celulare, iar ceea ce depăşeşte nevoile imediate este esterificat de acil-CoA colesterol acil transferază (colesterol ester sintetază) cu diverşi acizi graşi celulari, în special acid oleic şi acid palmitoleic. Esterii colesterolului din lipoproteinele plasmatice cuprind drept acid gras predominant acidul linoleic, ei fiind sintetizaţi sub acţiunea enzimei LCAT. Esterii intracelulari de colesterol sînt depozitaţi în citoplasmă sub formă de cristale lichide.

Colesterolul liber furnizat de β-lipoproteinele plasmatice exercită o acţiune represivă asupra sintezei de novo a colesterolului, punctul de control fiind situat la nivelul hidroximetil-glutaril-CoA reductazei (HMG-CoA reductaza). Ţesuturile nehepatice menţin sinteza colesterolului la nivel scăzut în

Scanned with OKEN Scanner

comparaţie cu ficatul, nu pentru că au o capacitate sintetică redusă, ci pentru că ele utilizează pentru nevoile proprii colesterolul din lipoproteinele plasmatice.

Potrivit concepţiei lui Goldstein şi Brown, „calea β-lipoproteinelor" are un rol de reglare, atît a conţinutului intracelular de colesterol, cît şi a nivelului plasmatic de β-lipoproteine. Numărul de receptori celulari pentru β-lipoproteine variază în raport cu diverşi factori endogeni (natura celulei, starea sa funcţională) sau exogeni (concentraţia lipoproteinelor). Cantitatea de β-lipoproteine la care sînt expuse celulele, reglează prin feed-back negativ numărul receptorilor membranari. În acest fel se previne acumularea colesterolului în celule şi, pe de altă parte, face posibilă acoperirea nevoilor celulare de colesterol la niveluri relativ scăzute de lipoproteine extracelulare. În mod normal, în stare staţionară, numărul de receptori este mijlociu şi cantităţile de colesterol obţinute din β-lipoproteine menţin sinteza endogenă la nivel scăzut, depozitele de esteri ai colesterolului sînt mici. Scăderea concentraţiei β-lipoproteinelor în lichidul interstiţial determină creşterea numărului de receptori membranari şi intensificarea captării de β-lipoproteine. În acelaşi timp este reluată sinteza de novo a colesterolului prin derepresia HMG-CoA reductazei iar esterii colesterolului din depozitele intracelulare sînt hidrolizaţi furnizînd colesterol ce este pus la dispoziţia celulei pentru sinteza structurilor membranare. Creşterea concentraţiei β-lipoproteinelor determină modificări inverse a celor de mai sus. În primul rînd, receptorii celulari existenţi se saturează cu β-lipoproteine furnizînd celulei mai mult colesterol. Acesta din urmă acumulîndu-se în celulă, pe de o parte, inhibă sinteza endogenă prin represia HMG-CoA reductazei şi, pe de altă parte, determină regresia numărului de receptori pentru β-lipoproteine, celula revenind la o stare staţionară.

Goldstein şi Brown atribuie „căii β-lipoproteinelor" un rol important în prevenirea aterosclerozei, acest mecanism de aprovizonare cu colesterol a celulelor nehepatice împiedică acumulările excesive de colesterol, factor patogenic esenţial în ateroscleroză.

Din examinarea unui număr mare de bolnavi cu hiperlipoproteinemii primare, s-a constatat că defectele genetice ale unora sînt localizate la nivelul „căii β-lipoproteinelor". La persoanele la care numărul de receptori celulari pentru β-lipoproteine este redus genetic, concentraţiile plasmatice de β-lipoproteine şi de colesterol sînt considerabil crescute, colesterolul se acumulează atît în spaţiile intercelulare, cît şi intracelular. Ateroscleroza este evidentă din primii ani de viaţă şi riscul de accidente vasculare este foarte ridicat.

6.3. BIOSINTEZA COLESTEROLULUI

În organism colesterolul este sintetizat pornindu-se de la precursori simpli. Ţesuturile care deţin primele locuri în ceea ce priveşte producţia de colesterol sînt ficatul, intestinul, cortexul adrenalelor şi glandele sexuale. Substanţa nervoasă este sediul unei sinteze active de colesterol numai în timpul mielinizării nervilor care are loc în ultima perioadă a vieţii intrauterine şi imediat după naştere şi acest fond de colesterol este metabolic inert. Colesterolul sintetizat în testicul, ovar, adrenale, este utilizat in situ pentru sinteza hormonilor

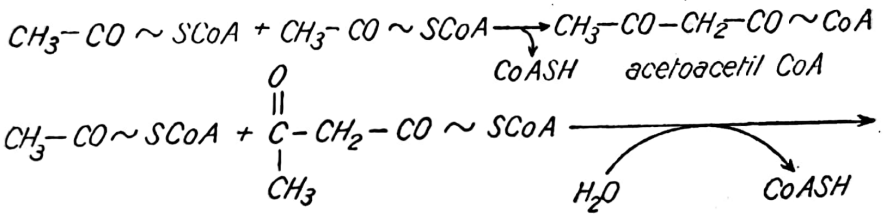
Scanned with OKEN Scanner

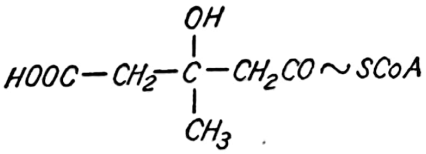
specifici şi nici acest fond de colesterol nu participă la circuitul metabolic al colesterolului. Ficatul este furnizorul principal de colesterol plasmatic şi totodată este locul de tranzit al colesterolului din alte ţesuturi. Locul al doilea, după ficat, în ceea ce priveşte activitatea biosintetică îl deţine intestinul.

Materia primă pentru sinteza colesterolului este acetil-CoA care poate fi obţinută în principiu, atît din glucide cît şi din grăsimi şi aminoacizi. Glucoza generează acetil-CoA prin degradare la acid piruvic, via secvenţa Embden-Meyerhof şi decarboxilare oxidativă a acestui metabolit; acizii graşi prin β-oxidare; mulţi aminoacizi prin desaminare şi remanierea catenelor ternare dau naştere la acetil-CoA. Grăsimile care dau cea mai mare cantitate de acetil-CoA sînt materia primă principală pentru sinteza colesterolului.

Colesterolul cuprinde 27 atomi de carbon şi toţi provin din resturile acetil din acetil-CoA. Pentru obţinerea unei molecule de colesterol se utilizează 18 molecule de acetil-CoA, în cursul biosintezei pierzîndu-se 9 atomi de carbon. Biosinteza colesterolului poate fi împărţită în mai multe etape:

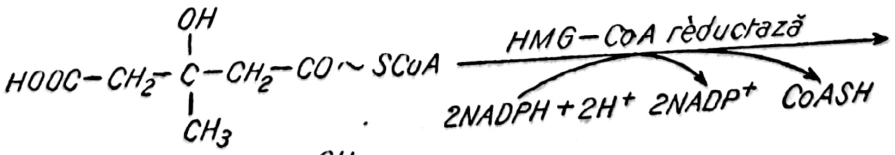
a) Într-o primă etapă are loc sinteza derivatului β-hidroxi-β-metil-glutaril-CoA (HMG-CoA), prin condensarea a trei molecule de acetil-CoA (etapă comună şi pentru sinteza de corpi cetonici):

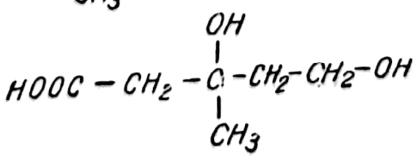




HMG-CoA

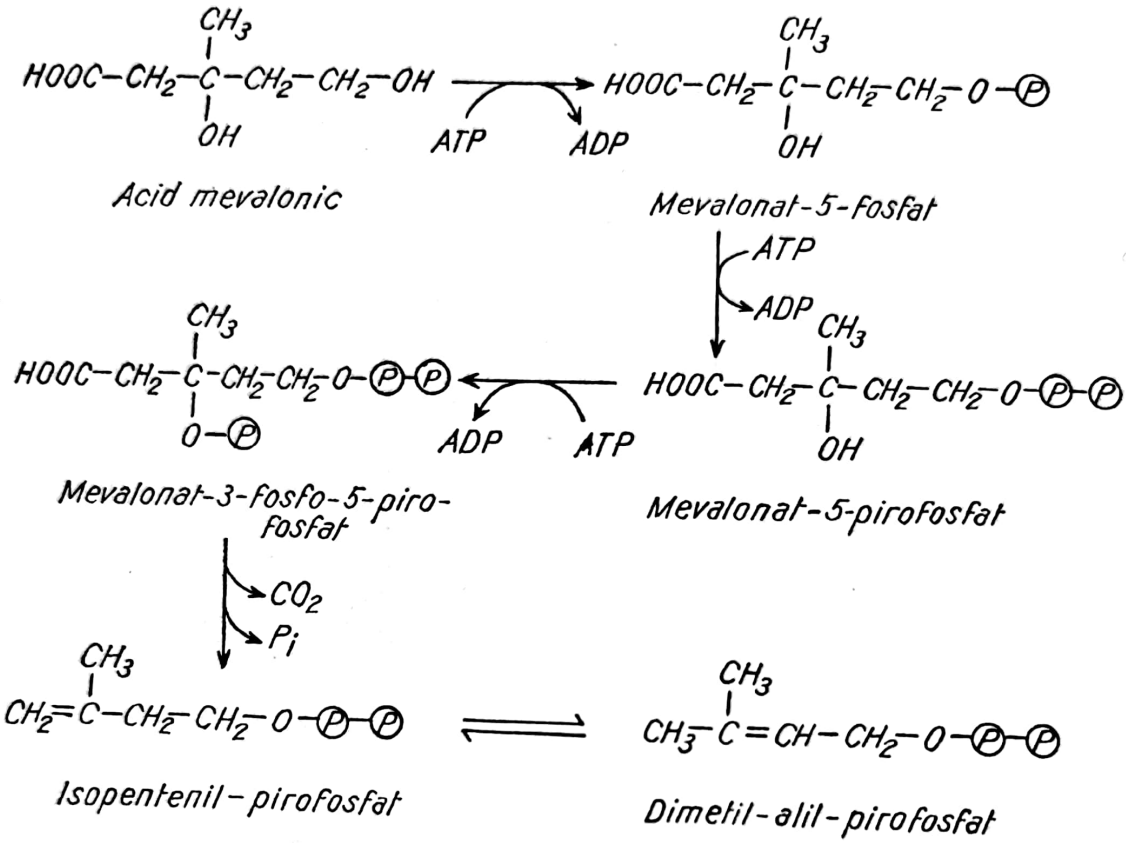
Următoarea reacţie este specifică biosintezei colesterolului şi constă în reducerea HMG-CoA la un alcool-acid, acidul mevalonic. Această reacţie limitează ritmul sintezei de colesterol, HMG-CoA reductaza fiind enzima reglatoare a procesului:





acid mevalonic

Din acidul mevalonic se obţine apoi esterul pirofosforic al unui alcool nesaturat (penten-ol). Acesta există în două forme izomere, izopentenil-pirofosfat şi dimetil-alil-pirofosfat:



Acest compus cu cinci atomi de carbon cuprinde unitatea repetitivă a compuşilor de natură poliizoprenică:

$$-(CH_2-C(CH_3)=CH-CH_2)-$$

şi este denumit izopren biologic activ. Prin condensarea succesivă dă naştere la compuşi poliizoprenici cu 10, 15 şi apoi cu 30 atomi de carbon (fig. X.15). Hidrocarbura cu 30 atomi de carbon — scualenul — are o structură liniară dar scriind-o în mod convenabil se poate observa înrudirea sa cu nucleul tetraciclic al steranului. Din scualen prin ciclizare şi oxidare se obţine primul compus steroidic (cu 30 atomi de carbon) lanosterolul; din acesta se obţine apoi colesterol (fig. X.15).

Sinteza colesterolului este un proces endergonic (este cuplat cu hidroliza a 36 legături macroergice din ATP) şi intens reductiv. Echivalenţii reductori, atomi de hidrogen şi electroni, sînt furnizaţi de NADPH (16 molecule).

Sinteza hepatică de colesterol este supusă unui control riguros atît metabolic cît şi hormonal. În primul rînd sinteza colesterolului poate fi reglată prin disponibilităţile organismului de materii prime generatoare de acetil-CoA, de energie (ATP) şi de agenţi reductori (NADPH). Controlul metabolic al biosintezei colesterolului se exercită la nivelul reacţiei de transformare a

HMG-CoA în acid mevalonic, prima reacţie specifică acestei căi biosintetice. Activitatea HMG—CoA reductazei hepatice este controlată de colesterol, produsul final al secvenţei. Nu se ştie dacă produsul final acţionează ca inhi-

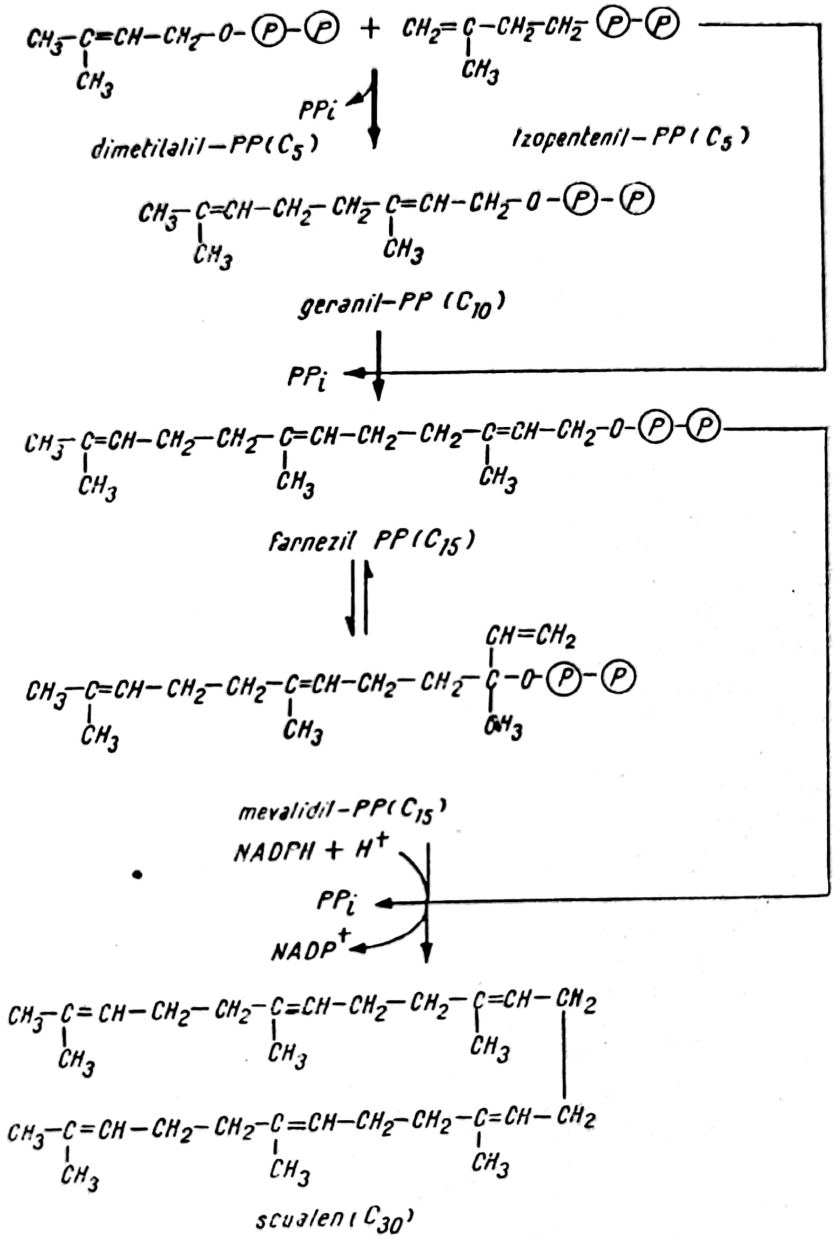


Fig. X.15. Sinteza scualenului din izoprenul activ.

bitor alosteric al enzimei (inhibiţie feed-back) sau prin represia sintezei proteinei enzimatice. Sinteza colesterolului în celulele mucoasei intestinale nu este reglată însă de colesterol ci de acizii biliari, care sînt inhibitori ai HMG-CoA reductazei. Acizii biliari (indirect) controlează cantitatea de colesterol hepatic. Dacă acizii biliari sînt eliminaţi mai rapid pe cale intestinală, se reduce debitul circuitului entero-hepatic al acizilor biliari şi va avea loc transformarea unor cantităţi mai mari de colesterol în acizi biliari. Prin aceasta

Scanned with OKEN Scanner

are loc o depleţie a organismului în colesterol. Administrarea orală de răşini care leagă acizii biliari şi îi elimină din organism este un procedeu de de scădere a colesterolului hepatic şi implicit a colesterolemiei.

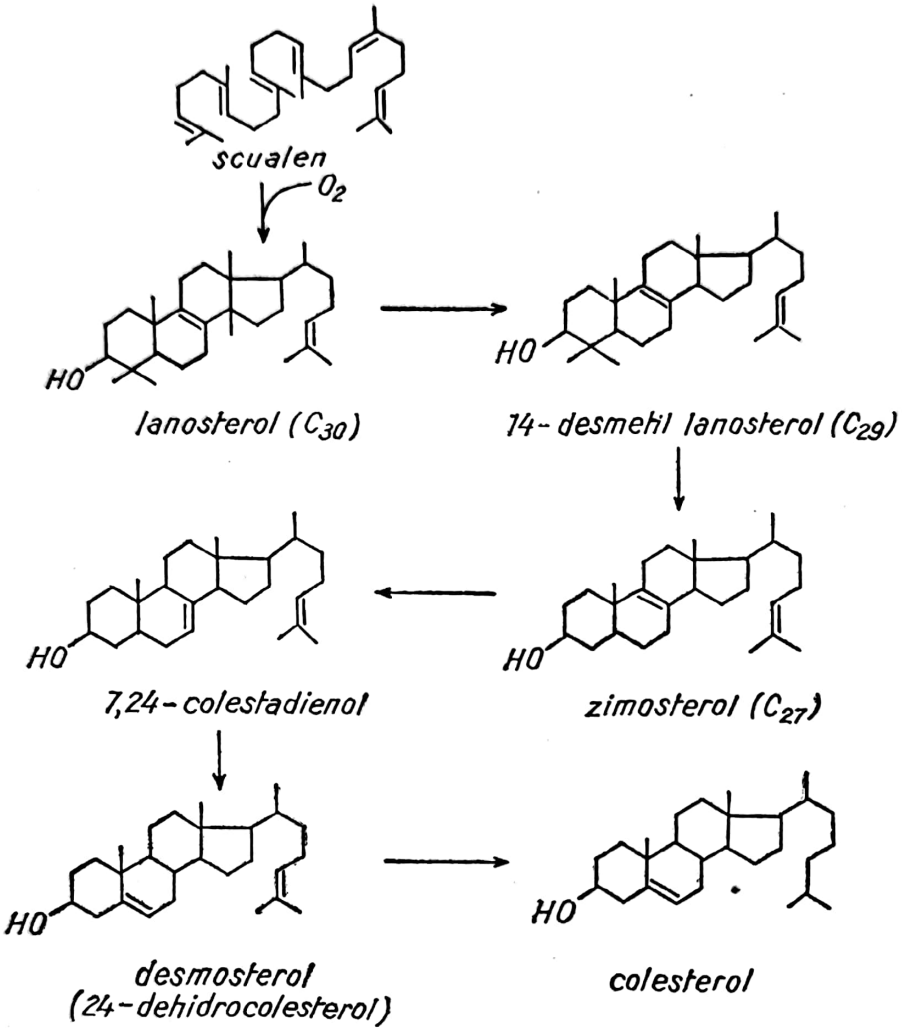


Fig. X.16. Transformarea scualenului în colesterol.

6.4. CATABOLISMUL COLESTEROLULUI

Spre deosebire de alţi componenţi de care organismul se debarasează prin degradarea moleculelor lor la compuşi simpli, eventual îi arde pînă la bioxid de carbon şi apă, nucleul tetraciclic din colesterol, ca şi din alţi steroizi, este eliminat intact din organism. Formele de eliminare a colesterolului sînt atît cea de colesterol ca atare, dar mai ales forma de acizi biliari. Calea principală de excreţie este bila, care cuprinde atît colesterol cît şi acizi biliari. O cale auxiliară de excreţie a colesterolului este mucoasa intestinală. Ţinînd seama de importanţa excreţiei biliare a colesterolului rezultă că tranzitul colesterolului prin ficat este obligatoriu în vederea eliminării sale. Mai trebuie subliniat că acizii biliari în afară de faptul că reprezintă o cale de excreţie a colesterolului, ei îndeplinesc şi funcţii specifice la digestia şi absorbţia intestinală a lipidelor.

Scanned with OKEN Scanner

Bila cuprinde colesterol, care în cea mai mare parte este liber. Bila hepatică la copil cuprinde aproximativ 20 mg/100 ml, iar la adult 80—180 mg/ml. Colesterolul este menţinut în soluţie prin asocierea sa cu acizi biliari şi cu fosfolipide. Solubilizarea colesterolului necesită un raport bine determinat al celor trei componente, astfel că modificări cantitative minore ale uneia dintre ele duc la precipitarea colesterolului. Prin depunerea colesterolului în jurul unui nucleu format din proteine şi bilirubină rezultă cristale care opresc total sau parţial fluxul bilei (colelitiază).

În intestin colesterolul neabsorbit, atît cel adus de bilă cît şi cel care provine din alimente sau din celulele descuamate ale peretelui intestinal, este supus acţiunii florei bacteriene care îl transformă în sterolii saturaţi izomeri — colestanol şi coprostanol — ce sînt eliminaţi cu fecalele.

Transformarea colesterolului în acizi biliari este calea cea mai importantă de catabolizare a colesterolului. Acizii biliari sînt sintetizaţi în hepatocite, sînt eliberaţi în canaliculele biliare şi după un tranzit prin vezica biliară sînt deversaţi cu bila în duoden. Acizii sintetizaţi în ficat sînt denumiţi acizi biliari primari. Cel mai important reprezentant este acidul colic (3α, 7α, 12α-trihidroxicolanic), după care urmează acidul chenodesoxicolic (acid 3α, 7α-dihidroxicolanic). În ficat acizii biliari sînt legaţi amidic de aminoacidul glicocol sau de taurină ($H_2N—CH_2—CH_2—SO_3H$) rezultînd acizi biliari conjugaţi. Acidul colic formează acidul glicocolic (colil-$NH—CH_2COOH$) şi taurocolic (colil-$NH—CH_2—CH_2—SO_3H$). Acizii biliari conjugaţi cuprind de asemenea grupări acide şi la pH-ul bilei şi al intestinului sînt ionizaţi găsindu-se ca săruri (săruri biliare).

În intestin acizii biliari suferă transformări catalizate de enzimele elaborate de microorganismele care populează în special, porţiunea terminală a ileonului şi colonul. Acestea constau în primul rînd în hidroliza legăturii amidice şi în pierderea grupării hidroxil din poziţia C_7. Din acidul colic se formează acidul dezoxicolic (acid 3α, 12α-dihidroxicolanic), iar din acidul chenodezoxicolic, acidul litocolic (acid 3α-hidroxi-colanic). Acidul dezoxicolic şi alţi acizi biliari formaţi în acelaşi mod, sînt numiţi acizi biliari secundari.

Acizii biliari la nivelul intestinului participă la emulsionarea şi la micelizarea lipidelor, proces indispensabil hidrolizei digestive şi absorbţiei lor prin mucoasa intestinală. Absorbţia lipidelor este practic completă în porţiunea proximală a ileonului. În segmentul distal al ileonului acizii biliari primari sau secundari, sînt reabsorbiţi printr-un mecanism de transport activ şi se reîntorc la ficat odată cu sîngele portal. În ficat acizii biliari sînt din nou conjugaţi şi eliberaţi în bilă şi mai departe în intestin. Se realizează în acest fel circuitul entero-hepatic al acizilor biliari.

La fiecare tură a circuitului entero-hepatic o cantitate oarecare de acizi biliari scapă reabsorbţiei şi sînt eliminaţi cu fecalele. Această pierdere netă de acizi biliari reprezintă o cale de excreţie a colesterolului. Se evaluează că o moleculă individuală de acid biliar parcurge de cîteva ori circuitul ficat-intestin-ficat înainte de a fi eliminată. Ţinînd seama că fondul de acizi biliari al unui adult este 3—5 g şi că acesta circulă de 5—6 ori, rezultă că 20—30 g de acizi biliari trec zilnic prin circuitul entero-hepatic. Pierderile de acizi biliari prin fecale sînt apreciate la 0,5 g/zi şi această cantitate este înlocuită prin sinteză din colesterol.

Scanned with OKEN Scanner

7. DISLIPIDEMIILE

Plasma vehiculează cantităţi importante de lipide care suferă oscilaţii ample în raport cu diverşi factori nutriţionali, metabolici sau hormonali, prin modificarea vitezei influxului sau efluxului lor plasmatic. Studii epidemiologice întreprinse în ultimii 10—15 ani au stabilit o corelaţie strînsă între modificarea tabloului lipidic sanguin şi incidenţa bolilor cardio-vasculare. Niveluri plasmatice ridicate de colesterol şi/sau de trigliceride sînt considerate factori de risc în ateroscleroză.

Modificarea concentraţiei lipidelor totale plasmatice sau alterarea raportului dintre diversele componente este denumită dislipidemie. Dacă ţinem seama că lipidele sînt încorporate în complexe lipoproteice rezultă că orice dislipidemie este o dislipoproteinemie. Pentru diagnosticarea corectă a dislipidemiilor este necesară asocierea analizelor chimice cu electroforeza lipoproteinelor. La un subiect sănătos lipidograma efectuată pe sînge recoltat după 12—14 ore de la ultima masă cuprinde numai benzile corespunzătoare α- şi β-lipoproteinelor. Chilomicronii sînt absenţi iar pre-β-lipoproteinele dau o bandă îngustă şi foarte slabă.

Dislipoproteinemiile sînt hiper- sau hipolipoproteinemii, ultimele fiind mult mai rar întîlnite decît primele. Hiperlipoproteinemiile pot fi rezultatul unei modificări cantitative a fracţiunilor normale α- sau β-lipoproteine, ori sînt caracterizate prin apariţia chilomicronilor şi/sau prin creşterea concentraţiei pre-β-lipoproteinelor. Dislipidemiile apar fie ca tulburări ereditare datorate alterării genetice a mecanismelor de transport, de sinteză sau de utilizare a

Tabelul X.6

Modificările lipidelor plasmatice în dislipoproteinemii

Dislipoproteinemia	Lipide plasmatice		Lipidograma
	Trigliceride	Colesterol total	
Abetalipoproteinemie	↓↓↓	↓↓↓	Numai banda α.
Hiperlipoproteinemie de tipul I	↑↑↑	↓	Prezentă banda chilomicronilor; celelalte benzi diminuate.
Hiperlipoproteinemie de tipul II	variabile (±)	↑↑↑	Banda β mult intensificată; în tipul IIb banda pre-β este intensificată; în tipul II apre-β-lipoproteinele nu sînt crescute.
Hiperlipoproteinemie de tipul III	↑	↑↑	Banda β lărgită.
Hiperlipoproteinemie de tipul IV	↑↑	↑	Banda pre-β intensă.
Hiperlipoproteinemie de tipul V	↑↑	↑	Banda pre-β şi banda chilomicronilor intense.

Scanned with OKEN Scanner

lipidelor, fie ca dereglări secundare corelative altor maladii. Nu este posibilă însă totdeauna încadrarea unei dislipidemii într-o categorie sau alta. În tabelul X.6 sînt arătate caracteristicile biochimice ale dislipidemiilor.

7.1. HIPOLIPOPROTEINEMIILE

O dislipidemie cu scăderea cantităţii de lipide plasmatice este abetalipoproteinemia. Maladie ereditară datorată unui defect genetic al sintezei unei proteine din structura β-lipoproteinelor. Bolnavii cu acest defect nu pot sintetiza β-lipoproteine. Concentraţiile trigliceridelor şi colesterolului sînt foarte joase. Bolnavii nu pot absorbi lipidele alimentare ceea ce duce la eliminarea lor prin fecale (steatoree); incapacitatea de export a trigliceridelor hepatice duce la infiltraţia grasă a ficatului (steatoză). Boala are o incidenţă foarte scăzută dar examenul biochimic şi clinic al subiecţilor purtători ai acestui defect genetic a furnizat date preţioase pentru înţelegerea mecanismelor de transport plasmatic al lipidelor.

7.2. HIPERLIPOPROTEINEMIILE

După modificarea lipidogramelor, Fredrickson a împărţit lipoproteinemiile în cinci tipuri, I—V, tipul II fiind subdivizat în IIa şi IIb (a se vedea şi Cap. XIV). În formele lor pure aceste dislipidemii corespund unor defecte genetice dar în acelaşi timp sînt şi forme de manifestare ale unor boli cu etiologii diverse. Un tip de hiperlipoproteinemie (tipul II) corespunde unei creşteri marcate a concentraţiei β-lipoproteinelor. În celelalte cazuri anomalia lipidogramei este datorată prezenţei chilomicronilor şi/sau creşterii concentraţiei pre-β-lipoproteinelor în sîngele recoltat la 12 ore de la ultima masă. Aceste două fracţiuni lipoproteice sînt formele de transport pentru trigliceride şi hiperlipoproteinemia corespunde unei hipertrigliceridemii (hiperlipemie). Chilomicronii transportă trigliceridele absorbite din intestin şi hiperchilomicronemia mai este denumită şi hiperlipemie exogenă sau hiperlipemie indusă de grăsimi. Pre-β-lipoproteinele transportă trigliceridele sintetizate în ficat şi hiperprebetalipoproteinemia este o hiperlipemie endogenă sau, luîndu-se în consideraţie convertibilitatea glucozei în grăsimi, este adesea o hiperlipemie indusă de glucide. Colesterolul suferă modificări corelative variaţiilor trigliceridelor. Transportul unor cantităţi mari de trigliceride (endogene sau exogene) implică în mod necesar variaţii ale concentraţiei plasmatice a colesterolului, component structural atît al chilomicronilor cît şi al pre-β-lipoproteinelor.

7.2.1. HIPERLIPOPROTEINEMIA DE TIP I (HIPERCHILOMICRONEMIE, HIPERLIPEMIE INDUSĂ DE GRĂSIMI)

Caracteristic pentru această dislipidemie este prezenţa chilomicronilor în cantitate mare. Răspunsul lipemic la aceşti bolnavi este foarte intens şi persistent. Serul are un aspect lăptos şi prin păstrarea sa la rece se separă un strat cremos de trigliceride. Lipidograma cuprinde o bandă intensă în regiunea chilomicronilor. Trigliceridele sînt puternic crescute; colesterolul prezintă creşteri mai moderate. Defectul biochimic al acestei dislipidemii constă într-o deficienţă a lipoprotein-lipazei, enzimă implicată în epurarea plasmei de chilomicroni.

Scanned with OKEN Scanner

Boala se manifestă clinic din primele luni de viaţă, prin dureri abdominale, hepatosplenomegalie. Au loc depuneri de grăsimi în ţesuturi (xantoame). Incidenţa aterosclerozei la aceşti bolnavi este joasă.

7.2.2. HIPERLIPOPROTEINEMIA DE TIP II (HIPERBETALIPOPROTEINEMIE)

Subtipul IIa este caracterizat printr-o creştere pronunţată a β-lipoproteinelor, fracţiune în care colesterolul reprezintă aproximativ 50% din partea lipidică. Acest tip de hiperlipoproteinemie este asociat cu niveluri foarte ridicate de colesterol. Celelalte componente lipidice sînt mai puţin modificate. Fosfolipidele manifestă o tendinţă spre creştere. Subtipul IIb este caracterizat atît prin concentraţii ridicate de β-lipoproteine cît şi prin prezenţa în cantitate mare a pre-β-lipoproteinelor. Nu se cunosc defectele biochimice care generează aceste dislipidemii. Clinic hiperlipoproteinemia de tip IIa şi IIb se manifestă prin depuneri de colesterol şi grăsimi neutre în ţesuturi (xantoame) şi sub endoteliul vaselor (ateroame). Incidenţa la ateroscleroză este foarte crescută. Bolnavii cu aceste dislipidemii primare ereditare, mor în copilărie. Hiperbetalipoproteinemia apare simptomatic în diabet, obstrucţie biliară, sindrom nefrotic de diverse etiologii, hipertiroidism, în aceste ultime situaţii fiind adesea asociat şi cu o hipertrigliceridemie mai accentuată decît în cazul defectului genetic.

7.2.3. HIPERLIPOPROTEINEMIA DE TIP III (DISLIPIDEMIE CU BANDĂ β-LĂRGITĂ)

Este caracterizată printr-o bandă β lărgită rezultatul sintezei de β-lipoproteine anormale cu densitate mai mică. Colesterolul este crescut dar mai puţin decît în hiperlipoproteinemia de tip II; trigliceridele sînt moderat crescute. Nu se cunoaşte defectul biochimic al acestei dislipidemii. Incidenţa aterosclerozei la subiecţii care prezintă această anomalie ereditară este ridicată.

7.2.4. HIPERLIPOPROTEINEMIA DE TIP IV (HIPERPREBETALIPOPROTEINEMIE, HIPERLIPEMIE INDUSĂ DE GLUCIDE)

În această tulburare creşte concentraţia pre-β-lipoproteinelor, forma de transport a trigliceridelor sintetizate endogen. Concentraţia trigliceridelor este sensibil crescută, pe cînd colesterolul prezintă variaţii mai puţin accentuate. Acest tip de hiperlipemie rezultă printr-o sinteză masivă de trigliceride în ficat probabil datorită şi unei utilizări periferice redusă. Această tulburare este asociată frecvent cu diabetul. Consumul exagerat de glucide, în special de fructoză şi zaharoză, modifică tabloul lipidic sanguin în sensul unei hiperprebetalipoproteinemii, prin conversia hepatică a glucidelor în trigliceride.

7.2.5. HIPERLIPOPROTEINEMIA DE TIP V (HIPERLIPEMIE MIXTĂ)

Este caracterizată prin creşterea concentraţiei atît a chilomicronilor, cît şi a pre-β-lipoproteinelor. Această dislipidemie este greu de distins de tipurile I (hiperchilomicronemie) şi IV (hiperprebetalipoproteinemie) deoarece

Scanned with OKEN Scanner

aceste dislipidemii nu apar niciodată pure, fiecare fiind o asociaţie de diverse grade a celor două hiperlipoproteinemii. La aceşti bolnavi lipemia este crescută atît după mese bogate în lipide şi sărace în glucide (o hiperchilomicronemie) cît şi după ingerare de glucide (hiperprebetalipoproteinemie). După ingerarea unui prînz mixt sînt crescute ambele fracţiuni lipoproteice transportoare de trigliceride.

Modificarea lipidogramei în sensul acestui tip de dislipidemie este cea mai frecventă dereglare a metabolismului lipidic.

8. LIPIDOZELE (TULBURĂRI ALE METABOLISMULUI CELULAR AL LIPIDELOR)

Aceste boli familiale sînt caracterizate prin acumularea de sfingolipide în diverse organe în special în sistemul nervos. Leziunea biochimică constă în deficienţa uneia sau alteia dintre hidrolazele lisosomiale care participă la catabolizarea sfingolipidelor ceea ce duce la stocarea acestora în celule.

Boala Gaucher, descrisă încă din 1882, este caracterizată prin depozitarea de glucocerebrozide în celulele sistemului reticuloendotelial din diverse organe. Defectul enzimatic priveşte glucocerebrozidaza (glucozil-ceramid-β-galactozidază):

$$\text{glucocerebrozid (glucozil-ceramidă)} + H_2O \rightarrow \text{ceramidă} + \text{glucoză}.$$

Se cunosc trei forme ale bolii. Forma „adultă", fără tulburări nervoase, se manifestă prin hepatosplenomegalie, anemie, distrofii osoase. Poate fi întîlnită la copil, adolescent şi la adult. Se semnalează depozite de glucocerebrozide în viscere dar nu în creier. Forma acută infantilă, determinată de depozitări masive de glucocerebrozide în creier, se manifestă cu tulburări nervoase şi duce la moarte în primul an de viaţă. O a treia formă a bolii, cu tulburări nervoase, debutează mai tîrziu, între 2 şi 12 ani şi are manifestări clinice mai atenuate.

Boala Krabbe este determinată de absenţa galactocerebrozidazei (galactozil-ceramid-β-galactozidază):

$$\text{galactocerebrozid} + H_2O \rightarrow \text{galactoză} + \text{ceramidă}.$$

Este asociată cu tulburări mintale severe şi disfuncţii motorii prin demielinizarea progresivă a substanţei albe şi a nervilor.

Boala Tay-Sachs (idioţia amaurotică infantilă) cu atrofie optică, pigmentarea retinei, degenerescenţă cerebrală progresivă, duce la moarte în primii trei ani de viaţă. În formele juvenilă şi adultă manifestările clinice sînt mai atenuate şi supravieţuirea mai îndelungată. Biochimic, boala este caracterizată prin acumulare de gangliozide GM_2 în sistemul nervos ca urmare a deficienţei unei forme izoenzimatice a GM_2-neuraminidazei.

Gangliozidoza generalizată este determinată de deficienţa hidrolazei ce atacă prima legătură glicozidică (β-galactozidică) dintr-un gangliozid (GM_1):

galactozil-N-acetil-galactozaminil-galactozil -(N-acetil-neuraminil)-glucozil-ceramidă + H_2O →
galactoză + N-acetil-galactozaminil-galactozil -(N-acetil-neuraminil)-glucozil-ceramidă.

Gangliozidele se acumulează în sistemul nervos, în viscere şi alte ţesuturi. Boala se manifestă clinic prin tulburări nervoase, întîrziere mintală, hepatomegalie, leziuni retiniene, distrofii osoase.

Scanned with OKEN Scanner

Boala Fabry este caracterizată prin acumulare de di- şi trihexozil-ceramidă în vasele pielii, în muşchii netezi, epitelii renale, miocard. Defectul enzimatic priveşte β-galactozidaza care detaşează restul galactozil din tri- şi dihexozilceramidă:

galactozil-galactozil-glucozil-ceramidă + H_2O → galactoză + galactozil-glucozil-ceramidă.

Tabloul clinic este complex: insuficienţă cardiacă şi renală, leziuni oculare, angiokeratoame. Ereditatea bolii este legată de sex (cromosomul X) şi simptomatologia completă a bolii se întîlneşte doar la bărbaţi.

Boala Nieman-Pick este caracterizată prin acumulare de sfingomieline în ficat, splină, suprarenale, celule ganglionare, nervoase şi gliale. Defectul enzimatic este localizat la nivelul sfingomielinazei:

sfingomielină + H_2O → ceramidă + fosforilcolină

Clinic, boala se manifestă prin tulburări neurologice, demenţă, hepatosplenomegalie, xantomatoză eruptivă. Copiii purtători ai defectului enzimatic mor de timpuriu, rareori ating vîrsta de 5 ani.

Leucodistrofia metacromatică, este caracterizată prin acumulare de sulfatide în sistemul nervos central, ca urmare a deficienţei sulfatidazei.

sulfatid (HO_3S—O-galactozil-ceramidă) + H_2O → H_2SO_4 + galacto-cerebrozid (galactozil-ceramidă).

Se manifestă clinic prin tulburări nervoase, disfuncţii motorii. Defectul poate fi diagnosticat prenatal prin amniocenteză şi cercetarea enzimei în culturi de celule obţinute din lichidul amniotic.

Gangliozidozele-GM_2 sînt determinate de deficienţe la nivelul hexozaminidazelor ce detaşează N-acetil-hexozamina din gangliozidul GM_2:

N-acetil-galactozaminil-galactozil (N-acetil-neuraminil)-glucozil-ceramidă + H_2O → N-acetil-galactozamina + galactozil-(N-acetil-neuraminil)-glucozil-ceramidă.

Gangliozidul GM_2, substratul enzimei deficitare se acumulează în sistemul nervos central. În general, tabloul clinic este dominat de tulburări mintale progresive şi paralizii spastice. Se cunosc mai multe forme ale bolii.

Scanned with OKEN Scanner

Capitolul XI

METABOLISMUL PROTEINELOR ŞI AL AMINOACIZILOR

1. INTRODUCERE

Cea mai mare parte a proteinelor au roluri plastice, sînt elementele structurale ale celulelor şi ţesuturilor. Totodată, multe proteine îndeplinesc funcţii esenţiale pentru viaţă: sînt enzime, hormoni, elemente contractile, factori de apărare. În condiţii obişnuite proteinele nu au roluri energetice, în schimb în inaniţie, după epuizarea glucidelor şi a lipidelor de rezervă, arderea catenelor hidrocarbonate ale aminoacizilor, fie direct, fie după conversia lor în glucoză, permite supravieţuirea organismului.

Starea dinamică a proteinelor. Moleculele proteice ca toate biomoleculele, sînt complexe labile care se dezintegrează continuu pînă la aminoacizi pentru a fi din nou sintetizate, ceea ce determină reînnoirea permanentă a moleculelor, starea lor dinamică (aşa cum s-a arătat în Cap. VI).

Viteza de reînnoire a unei proteine este apreciată prin timpul ei de înjumătăţire ($T_{\frac{1}{2}}$). Global proteinele din organismul omului au un timp de înjumătăţire de 80 de zile. La şobolan, cu o viaţă biologică mai scurtă, proteinele se reînnoiesc mult mai rapid, au $T_{\frac{1}{2}}$ de aproximativ 17 zile. Diversele proteine din organism diferă mult prin vitezele lor de reînnoire. Activitatea metabolică cea mai ridicată o au proteinele hepatice ($T_{\frac{1}{2}}$ de 7—10 zile) şi din alte viscere: intestin, pancreas, splină, rinichi. Proteinele musculare, cele din piele şi din os se reînnoiesc mult mai lent. Proteinele plasmatice, dintre care majoritatea sînt sintetizate în ficat, au şi ele viteze mari de reînnoire.

În legătură cu mecanismele de dislocare intracelulară a proteinelor nu se ştie aproape nimic. Este certă doar constatarea că proteinele se reînnoiesc prin degradarea (hidroliza) lor completă pînă la aminoacizi şi resinteza lor din aceştia, aşa cum rezultă din studii în care s-au utilizat aminoacizi marcaţi cu ^{15}N şi care au dus la fundamentarea conceptului de stare dinamică. Sînt cunoscute proteaze celulare, catepsine, localizate în lisosomi. Ele funcţionează optimal la pH-uri acide (<6) şi intră în acţiune după eliberarea lor în citosol.

Bilanţurile azotate. Pentru ca proteinele să fie sintetizate în condiţiuni optime, celulele trebuie să aibă la dispoziţie toată gama celor 20 de aminoacizi şi în cantităţi convenabile. Aminoacizii rezultaţi prin dislocarea proteinelor proprii organismului sînt în cea mai mare parte reutilizaţi pentru sinteză de noi molecule. O parte din aceşti aminoacizi suferă însă transformări ireversibile ieşind din circuitul sintezei proteice. Cantităţile de aminoacizi care suferă aceste transformări ireversibile se pot evalua din cantitatea de compuşi azo-

Scanned with OKEN Scanner

taţi eliminaţi din organism pe diverse căi, excreţia renală fiind însă principala cale de eliminare. Componentul azotat urinar care cuprinde majoritatea azotului din aminoacizii cataboliza ţi este ureea. Azotul eliminat şi sub alte forme prin urină provine în cea mai mare parte tot din grupările azotate ale aminoacizilor. Astfel că prin dozarea tuturor componenţilor azotaţi urinari (N total) se stabileşte fracţiunea de azot proteic pierdută de către organism. Pierderi de azot au loc şi prin fecale, prin transpiraţie, prin descuamarea pielii, totuşi acestea sînt relativ mici şi sînt mai mult sau mai puţin constante la acelaşi individ. Pierderile ireversibile de azot proteic implică necesitatea înlocuirii sale continue prin aport exogen. Proteinele sînt singurele alimente azotate care furnizează organismului aminoacizii necesari, fie ca molecule intacte, fie ca furnizori de azot aminic (a se vedea mai departe distincţia dintre aminoacizi esenţiali şi neesenţiali).

Relaţia dintre intensitatea proceselor de sinteză a proteinelor şi de catabolizare ireversibilă a aminoacizilor prin care se elimină azotul proteic din organism, este apreciată prin stabilirea bilanţului azotat al organismului. Acesta este definit ca diferenţa dintre cantitatea de azot ingerat şi cantitatea de azot excretat (pentru simplitate numai prin urină). Un organism are un bilanţ azotat echilibrat cînd ingestia de compuşi azotaţi (de proteine) este egală cu excreţia. În starea de echilibru azotat, un organism nu reţine azot, aportul exogen de aminoacizi compensează pierderile, masa sa proteică este invariabilă. Un organism are bilanţ azotat negativ dacă ingestia este mai mică decît excreţia (N ingerat $<$N excretat). Organismul pierde azot din proteinele sale proprii, aportul exogen de azot nu este suficient (cantitativ sau calitativ) pentru a asigura resinteza tuturor proteinelor. Din contră, la un organism cu bilanţ azotat pozitiv (N ingerat $>$N excretat) are loc retenţie de azot prin creşterea masei sale proteice.

Un adult sănătos hrănit cu o raţie adecvată are un bilanţ azotat echilibrat. Organismele în creştere au bilanţuri azotate pozitive, ele reţin din azotul alimentar pentru dezvoltarea ţesuturilor şi a organelor. De asemenea, în perioadele de convalescenţă, de reparaţii tisulare, bilanţurile azotate se pozitivează. Din contră, în cursul bolilor consumptive, în infecţii, după traumatisme, hemoragii, bilanţurile azotate devin negative. Femeile gravide şi cele care alăptează, utilizînd aminoacizii şi pentru sinteza proteinelor fătului, şi a proteinelor din lapte, au bilanţuri pozitive.

Conţinutul în azot al unei proteine, al unei raţii alimentare, permite numai aprecierea aspectelor cantitative ale nutriţiei proteice. Sinteza proteinelor necesită 20 de aminoacizi distincţi şi prezenţa lor simultană şi în proporţii convenabile este o condiţie esenţială pentru utilizarea lor optimală, pentru menţinerea echilibrului azotat. Proteinele ca alimente posedă valoarea biologică cea mai înaltă cînd cuprind toţi cei 20 de aminoacizi în proporţii cît mai apropiate de compoziţia în aminoacizi a proteinelor tisulare. Proteinele de origine animală, ca cele din ouă, carne, lapte, au valoarea nutritivă cea mai înaltă; sînt considerate proteine de referinţă. Proteinele vegetale au valori nutritive mult mai reduse decît cele animale. Deficienţa unei proteine în unul sau mai mulţi aminoacizi sau disproporţiile între conţinuturile în anumiţi aminoacizi fac ca proteinele cu conţinuturi egale în azot să aibe valori nutritive diferite. În tabelul XI.1. se dau nevoile de proteine ale omului, în funcţie de vîrstă. Aceste nevoi sînt exprimate sub forma unei proteine de referinţă, cu valoarea biologică maximă.

Scanned with OKEN Scanner

Tabelul XI.1

Nevoile de proteine alimentare în funcţie de vîrstă
(după recomandările Organizaţiei Mondiale a Sănătăţii)

Vîrsta	Necesarul de proteine în grame proteină/kg greutate corporală per zi
Sugar	
0— 3 luni	2,3
3— 6 luni	1,8
6— 9 luni	1,5
9—12 luni	1,2
Copil şi adolescent	
1— 3 ani	0,88
3— 6 ani	0,81
6— 9 ani	0,77
9—12 ani	0,72
12—15 ani	0,70
15—19 ani	0,64
Adult	0,59

Aminoacizi esenţiali şi neesenţiali. În constituţia proteinelor intră 20 aminoacizi diferiţi. Sinteza tuturor acestor biomolecule fundamentale nu poate fi efectuată decît de către plante şi de unele specii de microorganisme. Omul şi alte animale în cursul evoluţiei au pierdut capacitatea de sinteză a opt aminoacizi pe care nu îi pot obţine decît prin aport exogen. Aceştia sînt aminoacizii esenţiali (sau indispensabili): *valina, leucina, izoleucina, lizina, metionina, treonina, fenilalanina* şi *triptofanul.* Doi aminoacizi, histidina şi arginina, sînt indispensabili pentru organismele în creştere, sinteza lor endogenă nu este suficientă pentru a acoperi nevoile mai mari din perioadele de creştere. Ei sînt numiţi aminoacizi semiesenţiali (parţial dispensabili). Ceilalţi 10 aminoacizi: *alanina, glicocolul, serina, tirozina, cisteina, prolina, acidul aspartic, asparagina, acidul glutamic* şi *glutamina* pot fi obţinuţi prin sinteză, sînt aminoacizi neesenţiali (dispensabili).

Sinteza aminoacizilor neesenţiali necesită o sursă pentru scheletul neazotat al moleculelor şi o sursă de azot pentru grupările aminice. Scheletul hidrocarbonat este furnizat de glucoză sau provine prin interconversiunea porţiunii neazotate a altor aminoacizi. Organismul omului are capacitatea de a utiliza, de a încorpora azotul din amoniac în aminoacizi. Reacţia de bază este aminarea reductivă a acidului α-cetoglutaric, catalizată de glutamat dehidrogenază (a se vedea reacţia mai departe). Totuşi, în mod obişnuit, raţia omului nu cuprinde amoniac astfel că în final azotul utilizat pentru sinteză de aminoacizi neesenţiali provine tot din aminoacizii alimentari.

Ţinînd seama de capacitatea organismului de a sintetiza unii aminoacizi din precursori neproteici, cu condiţia asigurării unei surse de azot, nutriţia azotată echilibrată trebuie să procure organismului:

— Toţi aminoacizii esenţiali şi în proporţii bine determinate.

— O sursă de azot pentru sinteza aminoacizilor neesenţiali care este reprezentată de un exces din oricare din aminoacizii neesenţiali sau chiar de amino-

acizi esenţiali (exceptînd lizina şi treonina). Amoniacul poate fi procurat ca săruri de amoniu (în experienţe de laborator).

— Raţia trebuie să cuprindă glucide (glucoză) care furnizează scheletul de atomi carbon al moleculelor de aminoacizi neesenţiali.

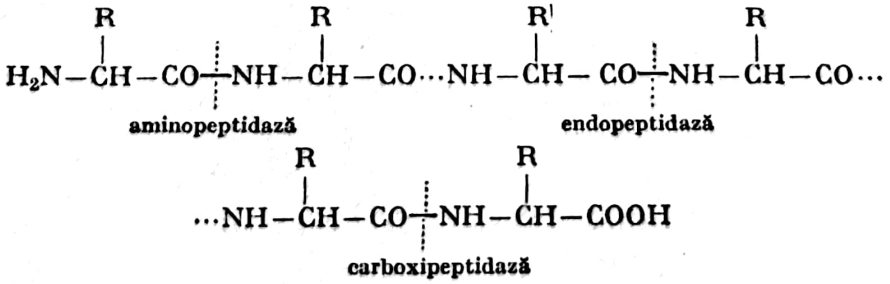
— Pentru a se preveni utilizarea energetică a aminoacizilor, raţiile alimentare trebuie să cuprindă glucide şi/sau lipide în cantităţi potrivite, astfel încît prin arderea lor să fie acoperit necesarul de energie metabolică a organismului.

Fondul metabolic comun al aminoacizilor. Aminoacizii liberi din organism provin pe mai multe căi: prin dislocarea proteinelor tisulare, din proteinele alimentare şi prin sinteza *de novo* din componenţi neproteici. Aceşti aminoacizi de provenienţe diferite se amestecă în ceea ce este denumit fondul metabolic comun al aminoacizilor (metabolic pool). Acest fond metabolic cuprinde totalitatea aminoacizilor din lichidele extracelulare şi el este, în principiu, accesibil tuturor celulelor care extrag din acest fond diverşi aminoacizi necesari sintezei proteice. Fondul metabolic al aminoacizilor cuprinde totuşi diverse compartimente şi circulaţia aminoacizilor nu se face cu aceeaşi viteză prin toate aceste sectoare.

Utilizarea aminoacizilor din fondul comun se face nediferenţiat, moleculele îşi pierd eticheta de endogen sau exogen, toate urmează aceleaşi transformări guvernate de legile hazardului. O moleculă individuală de aminoacid trece de mai multe ori prin acest fond, fiind încorporată în proteine şi apoi readusă în fondul comun, pînă va suferi o transformare ireversibilă care o scoate din circuitul metabolic. Pierderile ireversibile de aminoacizi din fondul comun al organismului constau în arderea catenelor hidrocarbonate ale moleculelor şi încorporarea azotului în uree sau transformarea aminoacizilor în alţi compuşi azotaţi neproteici ca purine, pirimidine, porfirine. Echilibrul azotat al organismului înseamnă o egalizare a intrărilor şi ieşirilor aminoacizilor din fondul metabolic comun.

2. DIGESTIA PROTEINELOR

În tubul digestiv proteinele sînt hidrolizate complet şi aminoacizii sînt absorbiţi prin mucoasa intestinală. Proteinele suferă acţiunea hidrolitică a peptidazelor elaborate de stomac, de intestin şi a celor cuprinse în secreţia pancreatică. După specificitate peptidazele se împart în endopeptidaze şi exopeptidaze, scindînd legături peptidice situate fie în mijlocul unui lanţ polipeptidic (endopeptidaze), fie la capetele acestuia (expopeptidaze). La rîndul lor, expopeptidazele sînt aminopeptidaze şi carboxipeptidaze după cum detaşează un aminoacid de la capătul N-terminal sau C-terminal al lanţului:

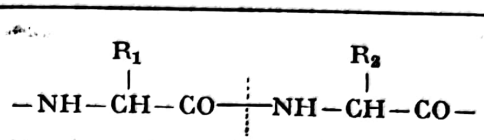
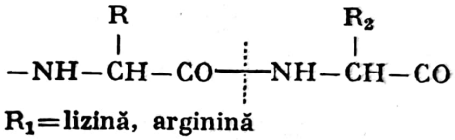
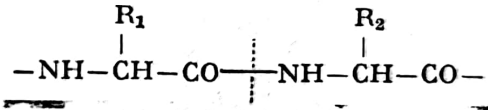
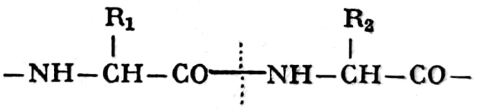
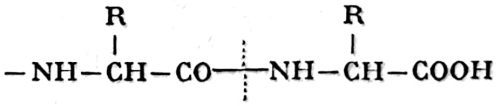
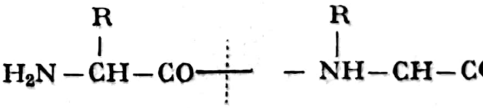
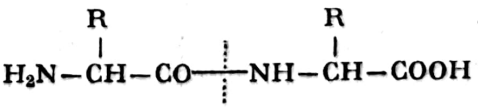


Dipeptidele sînt hidrolizate de enzime specifice denumite dipeptidaze.

Scanned with OKEN Scanner

Tabelul XI.2

Peptidazele digestive

Peptidaza	Țesutul care elaborează	Zimogen	Activarea zimogenului	Specificitatea de acțiune
Pepsina	Stomac	Pepsinogen	H^+ și pepsină	 R_2 = tirozină, fenilalanină
Gastricsina	Stomac	Pepsinogen	H^+ și pepsină	La fel ca și pepsina
Lab-fermentul (chimosina)	Stomac	Pro-lab-ferment	H^+ și autocatalitic	Coagulează laptele
Tripsina	Pancreas	Tripsinogen	Enterokinază și tripsină	 R_1 = lizină, arginină
Chimotripsină	Pancreas	Chimotripsinogen	Tripsină	 R_1 = fenilalanină, triozină, triptofan
Elastază	Pancreas	Proelastază	Tripsină	 R_1 și R_2 = aminoacizi hidrofobi
Carboxipeptidază	Pancreas	Procarboxipeptidază	Tripsină	
Aminopeptidază	Intestin	—	—	
Dipeptidază	Intestin	—	—	

Scanned with OKEN Scanner

Peptidazele digestive, cu excepţia celor intestinale, sînt elaborate iniţial sub forme catalitic inactive în scopul de a proteja celulele şi canalele secretoare de acţiunea lor proteolitică. Aceşti precursori inactivi sînt denumiţi proenzime sau zimogeni. Proteinele zimogene devin catalizatori activi în lumenul tubului digestiv. Activarea lor are loc prin hidroliza unor legături peptidice care fie că detaşează anumite peptide sau aminoacizi, fie că modifică plierea lanţului polipeptidic, demască centrul activ al enzimei, făcîndu-l accesibil substratului. Activarea zimogenului are loc în prezenţa ionilor de hidrogen sau sub acţiunea unor peptidaze active, procesul defăşurîndu-se de multe ori autocatalitic, enzima activîndu-şi propriul ei precursor.

În tabelul XI.2 sînt prezentate principalele enzime care participă la digestia proteinelor.

Pepsina este o endopeptidază elaborată de celulele mucoasei gastrice sub formă de pepsinogen. Activarea zimogenului are loc sub acţiunea acidului clorhidric stomacal sau se desfăşoară autocatalitic. Activarea este o hidroliză parţială a pepsinogenului din care se detaşează 42 de aminoacizi. Pepsina acţionează optimal la un pH cuprins între 1 şi 2 şi prezintă specificităţi pentru legăturile peptidice în care aminoacizii furnizori ai grupărilor aminice sînt tirozina şi fenilalanina.

Gastricsina se formează alături de pepsină în cursul activării pepsinogenului. Se deosebeşte de pepsină avînd un pH optim de acţiune mai ridicat, de aproximativ 3. La adult gastricsina reprezintă 1/3—1/2 din activitatea peptică a sucului gastric. La sugari însă gastricsina este enzima predominantă, întrucît la aceştia sucul gastric are o aciditate mai mică.

Lab-fermentul (chimosina) este prezentă numai în sucul gastric al sugarului fiind o peptidază a cărei funcţie principală este coagularea laptelui, prin care se întîrzie evacuarea conţinutului stomacal.

Sub acţiunea enzimelor enumerate mai sus, în stomac se scindează 1/10—1/5 din legăturile peptidice ale proteinelor. Hidroliza lor este continuată în intestin unde acţionează peptidazele pancreatice: tripsină, chimotripsină, elastază, carboxipeptidază şi cele intestinale, aminopeptidază şi dipeptidaze.

Tripsina este o endopeptidază pancreatică. Este elaborată ca tripsinogen care este activat sub acţiunea unei peptidaze intestinale specifice — enterokinaza — sau autocatalitic. Conversia tripsinogenului în tripsină implică detaşarea unui hexapeptid de la capătul N-terminal al tripsinogenului.

Tripsina are zona optimă de acţiune între pH 7 şi 8; ea prezintă specificitate pentru legăturile peptidice a căror grupare carboxil provine de la un aminoacid bazic, lizină sau arginină.

Chimotripsina este o endopeptidază pancreatică. Zimogenul ei (chimotripsinogen) este activat sub acţiunea tripsinei care detaşează patru aminoacizi sub forma a două dipeptide. Acţiunea hidrolitică a chimotripsinei se manifestă îndeosebi asupra legăturilor peptidice în care sînt implicate grupările carboxil ale fenilalaninei, tirozinei sau triptofanului.

Elastaza este o endopeptidază pancreatică secretată de pancreas ca proelastază şi activată în lumenul intestinal de tripsină. Această enzimă hidrolizează uşor elastina, dar prin specificitatea ei pentru legăturile peptidice ale aminoacizilor cu radicali hidrofobi participă şi la digestia altor proteine.

Carboxipeptidaza este o expopeptidază pancreatică secretată ca procarboxipeptidază şi este activată de tripsină. Detaşează hidrolitic aminoacizii de la capetele C-terminale ale lanţurilor peptidice.

Scanned with OKEN Scanner

Aminopeptidaza este o expopeptidază produsă de celulele mucoasei intestinale. Acţiunea ei hidrolitică se manifestă asupra capetelor N-terminale ale lanţurilor peptidice.

Dipeptidazele sînt un grup de enzime secretate de mucoasa intestinală şi care hidrolizează dipeptidele rezultate prin acţiunea celorlalte peptidaze digestive — endo sau expopeptidaze. Peptidazele enterice nu sînt eliberate în spaţiul luminal, ele acţionează ca şi alte hidrolaze digestive la nivelul marginii în perie a enterocitelor.

3. ABSORBŢIA AMINOACIZILOR

Aminoacizii eliberaţi prin hidroliza proteinelor traversează membrana intestinală şi prin sistemul port ajung la ficat. O parte sînt reţinuţi în acest organ, iar restul este distribuit prin circulaţia sistemică celorlalte ţesuturi.

Absorbţia aminoacizilor prin mucoasa intestinală este în parte o difuzie pasivă, dar în cea mai mare măsură este un transport mediat de proteine transportoare specifice (translocaze). Această traversare mediată, translocare, posedă unele trăsături ale reacţiilor enzimatice: prezintă fenomenul de saturare cu substrat, este specifică, este susceptibilă la acţiunea unor inhibitori. Proteinele transportoare de aminoacizi sînt specificate genetic şi modificarea informaţiei genetice corespunzătoare alterează capacitatea absorbtivă a mucoasei intestinale pentru unul sau mai mulţi aminoacizi. Aceste erori ereditare ale absorbţiei digestive a aminoacizilor determină grave tulburări de nutriţie sau metabolice.

Aminoacizii din plasmă sînt captaţi de către celule cu o viteză destul de mare. Concentraţia intracelulară a aminoacizilor este aproximativ de zece ori mai ridicată decît nivelul lor plasmatic în vederea asigurării celulelor cu cantităţi suficiente de aminoacizi şi în varietatea necesară sintezei eficiente a proteinelor. Transportul aminoacizilor peste bariera pe care o reprezintă membranele celulare este şi el mediat şi specific.

O fracţiune extrem de mică din aminoacizii plasmatici sînt eliminaţi prin urină. Aminoaciduria normală este de aproximativ 800 mg/24 h. Sistemele de transport tubular al aminoacizilor funcţionează cu o eficienţă foarte ridicată, explicînd astfel excreţia urinară scăzută a aminoacizilor. Aceste sisteme de transport sînt specifice pentru aminoacizi individuali sau pentru grupuri de aminoacizi şi sînt programate genetic. În legătură cu eliminarea urinară a aminoacizilor au fost descrise numeroase boli metabolice caracterizate prin eliminarea urinară excesivă a unuia sau mai multor aminoacizi (aminoacidurii patologice), ca urmare a alterării genelor care specifică proteinele transportoare.

4. METABOLISMUL GENERAL AL AMINOACIZILOR

Funcţia principală a aminoacizilor este aceea de a participa la construcţia moleculelor proteice. Pe lîngă aceasta mulţi aminoacizi iau parte la diverse reacţii biosintetice, furnizînd fie gruparea aminică fie scheletul hidrocarbonat sau ambele. În afară de participarea la reacţii anabolice toţi aminoacizii pot fi degradaţi în organism complet pînă la CO_2, H_2O şi NH_3. Fracţiunea din

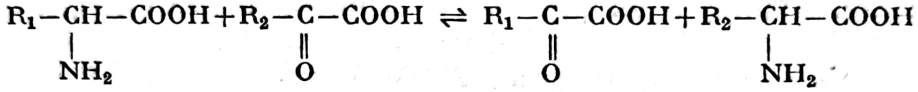
Scanned with OKEN Scanner

aminoacizii liberi din fondul comun al organismului care sînt degradaţi oxidativ depinde de diverşi factori ca aport exogen, aport caloric, nevoi energetice ale organismului. Intensitatea procesului de ardere, de catabolizare a aminoacizilor, este dată de cantitatea de uree excretată, compus care cuprinde azotul eliberat din aminoacizi.

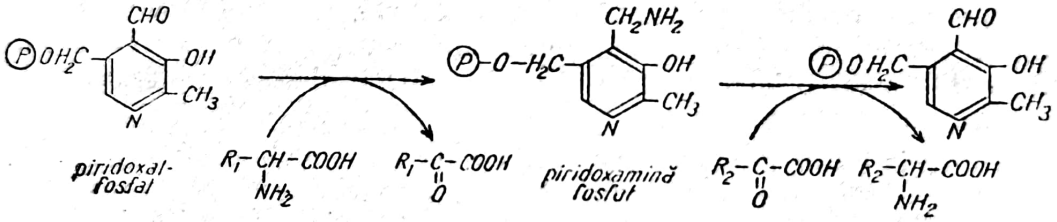
4.1. DEGRADAREA OXIDATIVĂ A AMINOACIZILOR

Acest proces presupune îndepărtarea grupării α-aminice din molecula aminoacizilor, dezaminarea şi apoi degradarea oxidativă a scheletului neazotat al moleculei. Paralel cu aceste reacţii are loc şi metabolismul azotului aminic.

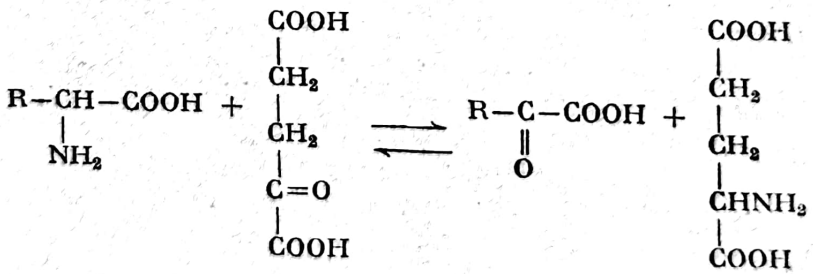
Dezaminarea. Dezaminarea aminoacizilor în ţesuturile animale se poate face prin două tipuri de reacţii; transaminare şi dezaminare oxidativă. Prin transaminare are loc un schimb de grupări aminice între un α-aminoacid şi un α-cetoacid:



Transaminările sînt piridoxal-fosfat dependente, coenzima preia gruparea aminică de la donator, cedînd-o apoi cetoacidului acceptor:



Transaminazele acţionează reversibil şi prezintă specificitate pentru una sau pentru ambele perechi de aminoacid-cetoacid. Transaminaza cea mai activă şi ubicuitar răspîndită este glutamat transaminaza care utilizează ca acceptor de grupări aminice acidul α-cetoglutaric, convertindu-l în acid glutamic. Ca donori de grupări aminice pot funcţiona majoritatea aminoacizilor:

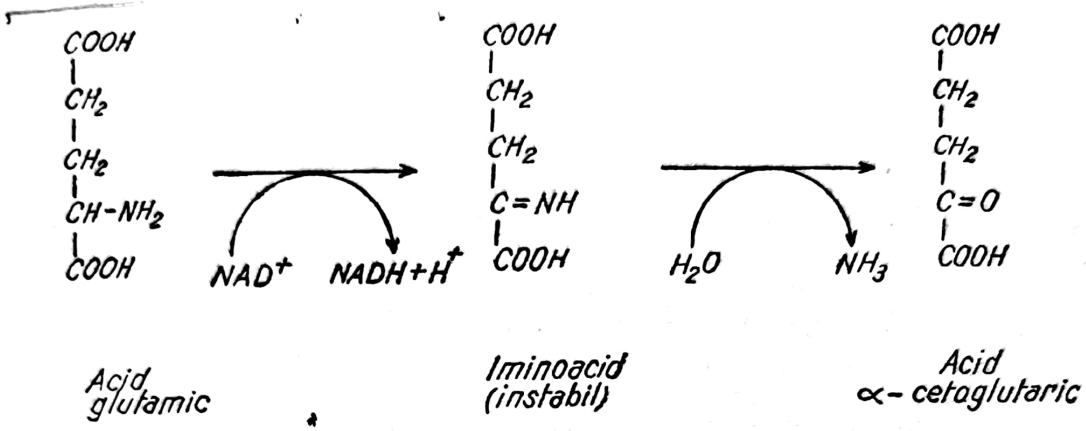


Reacţia are loc cu viteze diferite după natura aminoacidului. Cel mai activ donor de grupări aminice este aspartatul, după care urmează alanina, valina, leucina, izoleucina, tirozina, fenilalanina, metionina, triptofanul, arginina, cisteina. Participă mai greu la această reacţie glicocolul, serina, histidina, şi deloc lizina şi treonina. Această reacţie de transaminare are ca efect dezaminarea majorităţii aminoacizilor şi acumularea grupărilor lor aminice sub formă de acid glutamic.

O altă transaminază deosebit de activă utilizează ca cetoacid acceptor acidul piruvic pe care îl transformă în alanină. Întrucît alanina este un sub-

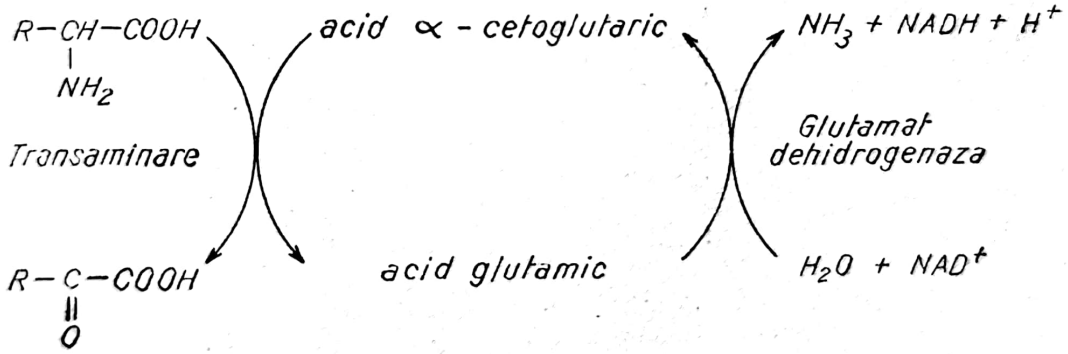
strat bun al glutamat-transaminazei, pe această cale grupările aminice ale aminoacizilor sînt încorporate în cele din urmă în acidul glutamic.

Pentru unii aminoacizi se utilizează şi alt gen de reacţii pentru îndepărtarea grupărilor aminice, reacţii ce sînt arătate în subcapitolul următor. Acidul glutamic printr-o reacţie de dezaminare dehidrogenantă (dezaminare oxidativă), eliberează amoniac şi reface acidul α-cetoglutaric:



Enzima glutamat dehidrogenaza este absolut specifică şi nici un alt aminoacid nu suferă o reacţie similară. Prin această reacţie glutamatul este descărcat de grupările aminice pe care le-a primit de la diverşi aminoacizi şi regenerează acidul α-cetoglutaric, care poate să accepte alte grupări aminice.

Prin cuplarea reacţiilor de transaminare la care participă acidul α-cetoglutaric şi dezaminarea oxidativă a acidului glutamic se realizează eliberarea azotului din aminoacizi ca NH_3 şi trecerea diverşilor aminoacizi în α-cetoacizii corespunzători:



Dezaminarea aminoacizilor prin cuplarea celor două genuri de reacţii, transdezaminare, are loc în toate celulele organismului totuşi, ficatul deţine primul loc în ceea ce priveşte intensitatea catabolismului aminoacizilor.

Degradarea scheletului neazotat al aminoacizilor. Prin dezaminare aminoacizii sînt transformaţi în cetoacizi (compuşi ternari) care în continuare vor fi degradaţi pe căile oxidative terminale, ciclul acizilor tricarboxilici şi lanţul respirator. Pătrunderea în aceste căi implică transformarea în intermediari ai secvenţelor glicolitice, în acid piruvic, în acetil-CoA sau într-un intermediar al ciclului Krebs. Pentru unii aminoacizi produsul imediat al transaminării sau al altei reacţii desaminante este unul din aceşti intermediari. De exemplu, aminoacizii, alanina, acidul aspartic, acidul glutamic prin îndepărtarea grupărilor aminice se transformă în acid piruvic, acid oxaloacetic şi respectiv acid α-cetoglutaric. Pentru alţi aminoacizi este necesară parcurgerea unor

Scanned with OKEN Scanner

reacţii auxiliare, pînă se ajunge la un compus ce poate pătrunde în ciclul acizilor tricarboxilici. Particularităţile metabolice ale fiecărui aminoacid sînt tratate mai departe.

4.2. GLUCONEOGENEZA DIN AMINOACIZI

Scheletul hidrocarbonat al aminoacizilor, pentru unii în totalitate, pentru alţii doar fragmentar, poate fi convertit în glucoză (gluconeogeneză). Cu excepţia leucinei, care nu furnizează nici un atom de carbon pentru gluconeogeneză, toţi ceilalţi aminoacizi sînt total sau parţial glucogenici. Fragmentele din moleculele aminoacizilor convertibile în glucoză sînt acelea care dau naştere la piruvat, la un intermediar al secvenţei Embden-Meyerhof sau al ciclului acizilor tricarboxilici. Atomii de carbon ai unui aminoacid care conduc la acetil-CoA sînt neglucogeni. Aceştia pot fi utilizaţi la sinteză de acizi graşi şi sînt potenţial generatori de corpi cetonici (aminoacizi cetogenici). Bineînţeles, sînt cetogenici acei aminoacizi care conduc la acid acetoacetic (tabelul XI.3).

Tabelul XI.3

Clasificarea aminoacizilor în glucogenici şi cetogenici

Aminoacizi glucogenici	Aminoacizi gucogenici şi cetogenici	Aminoacizi cetogenici
Alanină Arginină Aspartat Asparagină Cisteină Glutamat Glutamină Histidină Metionină Prolină Serină Treonină Valină	Izoleucină Lizină Fenilalanină Tirozină Triptofan	Leucină

Conversia aminoacizilor în glucoză reprezintă o utilizare energetică a aminoacizilor, deoarece glucoza are ca funcţie principală furnizarea de energie metabolică. Gluconeogeneza din aminoacizi este importantă în perioadele de foame, de solicitare a organismului şi este reglată hormonal.

4.3. DECARBOXILAREA

O altă reacţie degradativă importantă a aminoacizilor este decarboxilarea prin care aceştia se transformă în amine:

$$R-\underset{\displaystyle NH_2}{\underset{|}{CH}}-COOH \rightarrow R-CH_2-NH_2+CO_2$$

Reacţiile sînt catalizate de enzime specifice care utilizează drept coenzimă piridoxal-fosfatul.

Scanned with OKEN Scanner

Deşi decarboxilarea, cantitativ, nu reprezintă o cale majoră de metabolizare a aminoacizilor, totuşi acest gen de reacţie este foarte important deoarece multe amine obţinute prin decarboxilarea aminoacizilor au acţiuni biologice remarcabile, sau sînt intermediari în diverse reacţii anabolice. Astfel histidina prin decarboxilare dă naştere la histamină, acidul glutamic la acid γ-aminobutiric, serina la etanolamină. Flora microbiană intestinală este răspunzătoare de formarea multor amine în tubul digestiv şi care pot să ajungă în organism exercitînd acţiuni diverse.

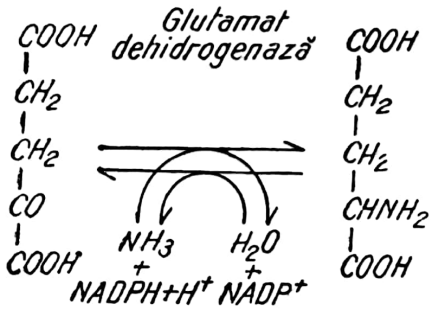
4.4. BIOSINTEZA AMINOACIZILOR NEESENŢIALI

Ţesuturile animale posedă echipament enzimatic complet şi eficient pentru sinteza a 10 aminoacizi. Aceşti aminoacizi neesenţiali pot lipsi din raţia alimentară, ei putînd fi înlocuiţi prin glucide care furnizează catena ternară şi printr-o sursă de azot. Opt aminoacizi sînt obligatoriu indispensabili, esenţiali. Arginina şi histidina sînt esenţiale pentru animalele în creştere.

Sinteza unui aminoacid are două faze: obţinerea cetoacidului corespunzător (R—CO—COOH) şi apoi înlocuirea grupării cetonice prin gruparea aminică.

Aminarea cetoacizilor are loc prin parcurgerea în sens opus a reacţiilor de dezaminare, care sînt uşor reversibile:

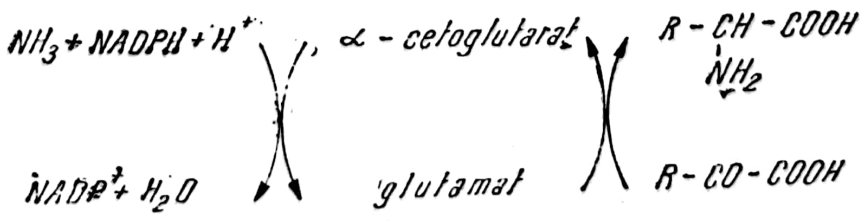
a) Acidul α-cetoglutaric poate fi aminat reductiv sub acţiunea glutamat dehidrogenazei. Donatorul de echivalenţi reducători poate fi atît NADH cît şi NADPH:



Această reacţie permite transformarea amoniacului într-o grupare α-NH_2 şi este principala reacţie prin care azotul anorganic este încorporat în grupările aminice ale aminoacizilor.

b) Prin reacţii de transaminare acidul glutamic cedează gruparea sa aminică la diverşi cetoacizi pe care îi transformă în aminoacizi.

Cele două reacţii cuplate pot fi prezentate:



Această etapă a metabolismului aminoacizilor — aminarea cetoacizilor și dezaminarea aminoacizilor — este ușor reversibilă pentru toți aminoacizii (cu excepția lizinei și treoninei) astfel încît organismul poate să efectueze sinteza tuturor aminoacizilor pornind de la cetoacizii corespunzători. Indispensabilitatea aminoacizilor zişi esențiali decurge din faptul că țesuturile nu au capacitatea de a sintetiza scheletele hidrocarbonate ale acestora și

Tabelul XI.4

Precursorii aminoacizilor esențiali și semiesențiali

Aminoacid	Furnizorul scheletului hidrocarbonat
Alanină	acid piruvic
Acid aspartic	acid oxaloacetic
Acid glutamic	acid α-cetoglutaric
Asparagina	acid aspartic
Glutamina	acid glutamic
Cisteina	serină (metionina furnizează S)
Serina	acid 3-P-gliceric
Glicocolul	serina
Prolina	acid glutamic
Tirozina	fenilalanina
Arginina	acid glutamic, via ornitină, în ciclul ureogenetic.

de aceea acești aminoacizi (sau numai cetoacizii lor) trebuie să fie obținuți din alimente. În organism toți aminoacizii esențiali sau neesențiali, participă la un schimb de grupări aminice dar numai aminoacizii neesențiali pot fi obținuți prin sinteză *de novo*.

Sinteza scheletului hidrocarbonat al aminoacizilor (*neesențiali*). Materia primă pentru sinteza *de novo* a aminoacizilor este glucoza. Acizii grași, sub formă de acetil-CoA, pot și ei să furnizeze unii dintre atomii de carbon ai aminoacizilor. Unii aminoacizi neesențiali rezultă parțial sau total din aminoacizii esențiali.

Cetoacizii corespunzători la trei dintre cei mai importanți aminoacizi — acidul aspartic, acidul glutamic și alanina — sînt obținuți direct din secvențele de metabolizare a glucozei. Acidul oxaloacetic și acidul α-cetoglutaric se formează în ciclul acizilor tricarboxilici, iar acidul piruvic este produsul secvenței Embden-Meyerhof. Mai mult decît atît, acidul piruvic prin carboxilare formează direct acid oxaloacetic. Acidul α-cetoglutaric prin aminare reductivă încorporează amoniac și dă naștere la acid glutamic care mai departe furnizează prin transaminare grupări aminice celorlalți cetoacizi. Transaminazele glutamat-oxaloacetat (GOT) și glutamat-piruvat (GPT) sînt deosebit de active și asigură o sinteză rapidă a acidului aspartic și a alaninei. Secvența Embden-Meyerhof mai furnizează scheletul hidrocarbonat al unui aminoacid important — serina. De la acești aminoacizi se pot obține alți aminoacizi neesențiali (tabelul XI.4), astfel încît majoritatea atomilor de carbon din moleculele aminoacizilor neesențiali provin din glucoză.

Scanned with OKEN Scanner

5. METABOLISMUL AMONIACULUI

Amoniacul ocupă un loc central în metabolismul proteinelor, luînd parte la reacţiile de sinteză şi de degradare a aminoacizilor. Prin dezaminarea aminoacizilor — rezultatul transaminărilor şi a dezaminării oxidative a acidului glutamic — azotul proteic este liberat ca amoniac. De asemenea, sinteza de novo a aminoacizilor implică utilizarea sa pentru obţinerea de noi grupări aminice. O moleculă de amoniac trece de mai multe ori prin forma de azot proteic înainte de a fi eliminată din organism. Forma de excreţie a amoniacului este ureea. Cantităţi foarte mici de amoniac sînt eliminate prin urină ca săruri de amoniu.

Sursele de amoniac ale organismului. Principala sursă este azotul din proteine care ajunge sub formă de amoniac prin reacţiile examinate mai înainte. Totuşi, mai sînt şi alte reacţii metabolice care eliberează amoniac. Acestea sînt:

— Hidroliza grupărilor amidice ale glutaminei şi asparaginei, catalizate de glutaminază şi, respectiv, de asparaginază. Hidroliza glutaminei este o reacţie extrem de importantă în metabolismul amoniacului la animale. La vegetale, asparagina îndeplineşte un rol asemănător cu al celui jucat de glutamină la animale.

— Dezaminarea derivaţilor aminaţi purinici şi piridinici, ca acid adenilic şi alţii (a se vedea Cap. XII).

— Hidroliza ureei, prezentă în secreţiile tubului digestiv, sub acţiunea urează, elaborată de bacteriile intestinale. Amoniacul rezultat pe această cale este absorbit prin mucoasa intestinală şi prin sistemul port este transportat la ficat.

— Degradarea resturilor proteice intestinale de către flora microbiană locală, absorbţia amoniacului şi transportul portal la ficat.

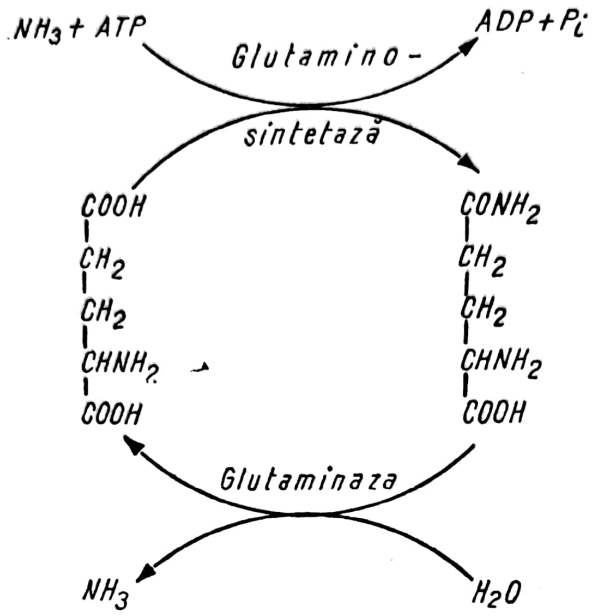
— Oxidarea aminelor ($R-CH_2-NH_2+\frac{1}{2}O_2 \rightarrow R-CHO+NH_3$) sub acţiunea unor aminooxidaze.

Transportul amoniacului. Cu toate că amoniacul se formează continuu în organism, totuşi concentraţia sa plasmatică şi intracelulară este foarte joasă, aproape nulă. Sîngele periferic cuprinde mai puţin de 10—20 μg/100 ml. Amoniacul este o substanţă foarte dăunătoare, în special pentru celulele nervoase şi organismul dispune de mecanisme foarte eficiente pentru a menţine scăzut nivelul acestui compus. Este necesar de aceea să se facă distincţie între reacţia de încorporare a amoniacului în uree care este un catabolit final, eliminat de organism, şi încorporarea sa temporară în anumiţi compuşi în vederea detoxifierii şi transportului. Forma de transport a amoniacului în organism este glutamina. Celulele care cuprind la un moment dat mai mult amoniac îl încorporează imediat în glutamină. În creier se sintetizează cantităţi relativ mari de glutamină pentru a se menţine practic nulă concentraţia amoniacului. Din glutamină, amoniacul este eliberat prin hidroliză. Funcţia de vehiculare a amoniacului face ca nivelul plasmatic al glutaminei să întreacă de cîteva ori concentraţia oricărui alt aminoacid. Diverşii aminoacizi au concentraţii plasmatice sub 3 mg/100 ml pe cînd concentraţia glutaminei este de aproximativ 8 mg/100 ml.

Sinteza şi hidroliza glutaminei au loc prin reacţii distincte, ambele ireversibile. Sinteza sa este catalizată de glutamino-sintetază (o ligază) şi reacţia

Scanned with OKEN Scanner

endergonică de formare a legăturii amidice este cuplată cu hidroliza unei legături macroergice din ATP; hidroliza este catalizată de glutaminază:



Biosinteza ureei. Ureea reprezintă forma de excreție a azotului din proteine și cantitatea de uree eliminată dă seama de intensitatea proceselor catabolice suferite de aminoacizi. Nivelul plasmatic al ureei la un adult sănătos este de 20—30 mg/100 ml și variază mult în funcție de aportul proteic, crescînd odată cu creșterea conținutului în proteine al rațiilor alimentare. Prin urină un adult excretă între 15 și 30 g uree în 24 ore. Nou-născutul elimină cantități mult mai mici decît un adult. În primele zile de viață eliminarea de uree este numai 40—70 mg uree/kg greutate corporală/24 ore, pe cînd excreția de uree a unui adult exprimată în același fel, mg uree per kg de greutate corporală/24 ore este de aproximativ 300 mg.

Sinteza ureei are loc printr-o secvență de reacții la care participă în mod ciclic trei aminoacizi — ornitina, citrulina și arginina — secvență cunoscută ca ciclul ureogenetic Krebs-Henseleit (fig. XI.1).

Ureea este diamida acidului carbonic ($H_2N-CO-NH_2$). Formarea sa din amoniac și acid carbonic este endergonică ($\Delta G° = +14$ Kcal).

$$HCO_3^- + 2\,NH_4^+ \rightarrow H_2N-CO-NH_2 + H_2O$$

Pentru efectuarea acestei sinteze endergonice organismul cheltuiește energie metabolică sub formă de ATP, asigurînd astfel desfășurarea rapidă și ireversibilă a procesului.

Etapele ciclului ureogenetic sînt:

a) *Sinteza carbamil-fosfatului* ($H_2N-CO-O-PO_3H_2$). Acest compus este anhidrida fosforică a monoamidei acidului carbonic, un compus instabil, ipotetic ($H_2N-CO-OH$). În organism carbamil-fosfatul este obținut prin reacția:

$$HCO_3^- + NH_4^+ + 2\,ATP \rightarrow O=C\begin{matrix}NH_2\\ O\sim PO_3H_2\end{matrix} + 2ADP + P_i$$

catalizată de carbamil-fosfat sintetază I. Această enzimă mitocondrială este activată alosteric de acetil-glutamat. Carbamil-fosfatul cuprinde prima legătură amidică din viitoarea moleculă de uree și gruparea carbamil (H_2N-CO-) este cedată cu ușurință ornitinei.

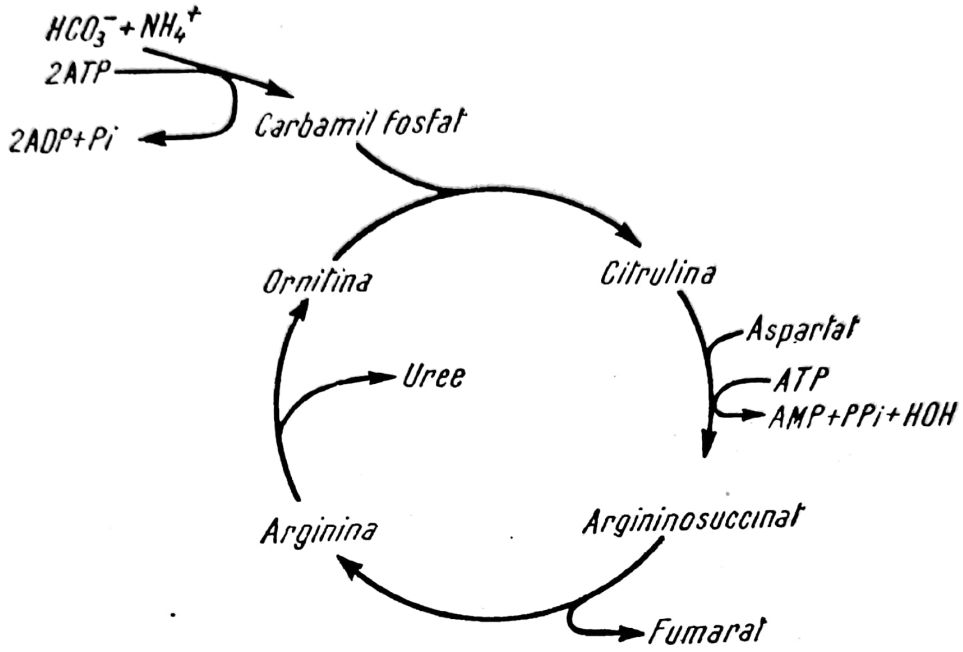
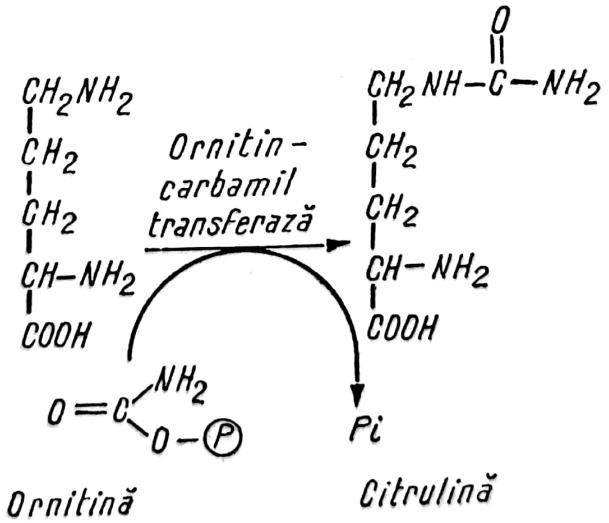


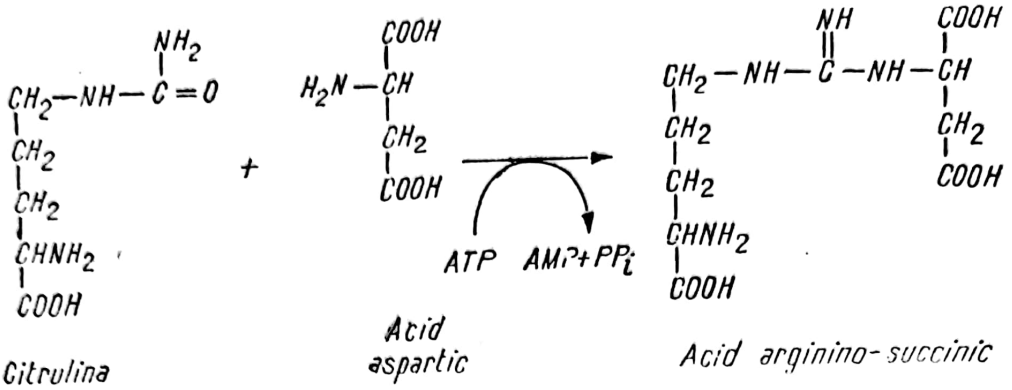
Fig. XI.1 Ciclul ureogenetic.

b) *Sinteza citrulinei*. Gruparea carbamil din carbamil-fosfat este transferată pe gruparea δ-aminică a ornitinei, rezultînd citrulina.

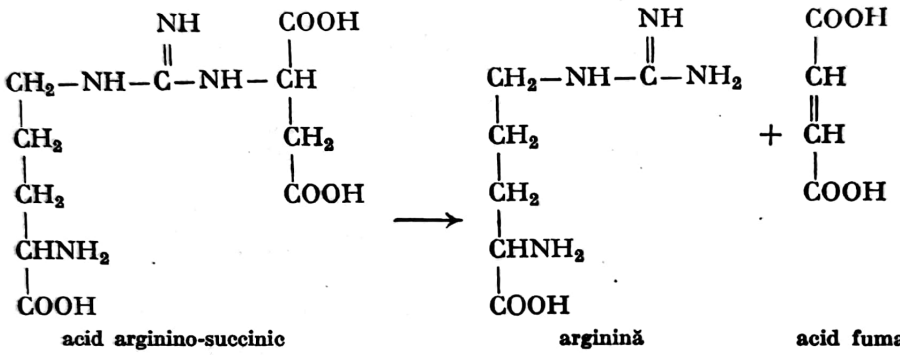


c) *Sinteza argininei*. Cel de al doilea atom de azot din molecula virtuală de uree este adus în ciclul ureogenetic de către o moleculă de acid aspartic. Aceasta se condensează cu citrulina, într-o reacție cuplată energetic cu hidroliza

ATP-ului, dînd naştere acidului arginino-succinic. Enzima este arginino-succinat sintetază:

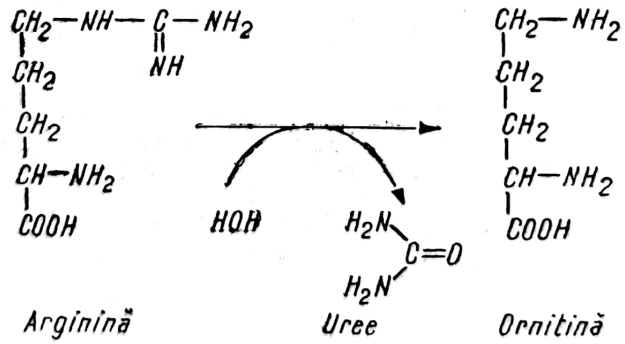


Acidul arginino-succinic suferă apoi o scindare în urma căreia se formează arginina şi acidul fumaric:



Acidul fumaric intră în ciclul acizilor tricarboxilici pentru a da naştere a acid oxaloacetic iar arginina suferă ultima reacţie a ciclului ureogenetic.

d) *Hidroliza argininei* eliberează ureea şi reface molecula de ornitină utilizată iniţial.



Dintre reacţiile ureogenezei, reacţiile a—c nu sînt specifice acestei căi metabolice. În primul rînd carbamil-fosfatul este utilizat şi pentru biosinteza nucleului pirimidinic. Împreună reacţiile a, b şi c reprezintă calea de biosinteză a aminoacidului arginină. Unica reacţie proprie ureogenezei este reacţia catalizată de arginază. Această enzimă este specifică organismelor care excretă azotul proteic sub formă de uree (animale ureotelice). Totodată arginaza se află numai în ficat, organul formator de uree. De asemenea, ornitin-carbamil-transferaza este o enzimă strict hepatică şi apariţia acestei enzime în plasmă

este un indiciu de lezare a parenchimului hepatic. Cantităţi mici de uree se formează totuşi în creier şi rinichi, dar această sinteză nu are semnificaţie în metabolismul azotului.

Aşa cum s-a menţionat mai înainte, ureea reprezintă pentru organism catabolitul final al azotului proteic. Atomii de azot din grupările aminice ale

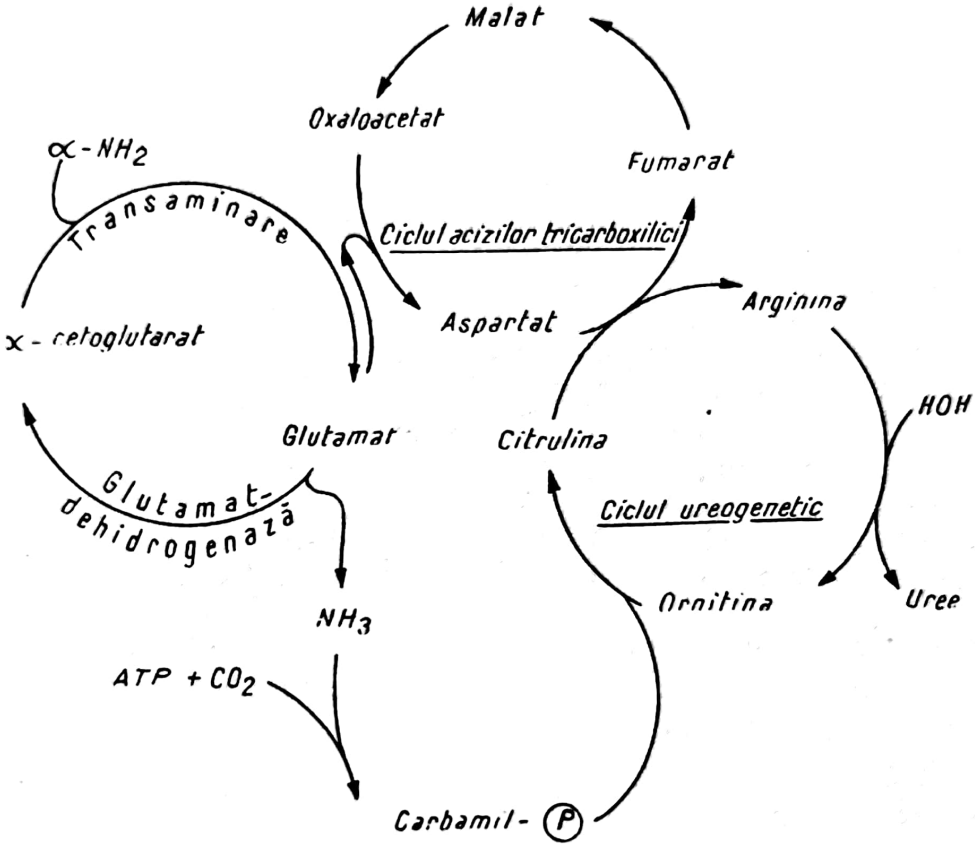


Fig. XI.2. Interrelaţiile dintre ciclul ureogenetic, ciclul acizilor tricarboxilici şi sistemul de dezaminare a aminoacizilor.

aminoacizilor participă la formarea ureei în două moduri: un atom intră în ciclul ureogenetic sub formă de amoniac, care este mai întîi încorporat în carbamil fosfat iar cel de al doilea atom este furnizat imediat de către acidul aspartic. Bineînţeles, acidul aspartic joacă în acest caz un rol de vehicul al grupărilor aminice. Acidul glutamic, colectorul grupărilor aminice, transaminează cu acidul oxaloacetic pentru a forma acid aspartic (transaminaza glutamat-oxaloacetat este foarte activă). Acidul aspartic cedează ciclului ureogenetic gruparea aminică. Acidul fumaric care rezultă după clivajul acidului arginino-succinic, prin reacţiile ciclului acizilor tricarboxilici, devine din nou acid oxaloacetic putînd transporta o nouă încărcătură de grupări aminice. Aceste relaţii între sistemul de desaminare a aminoacizilor, ciclul ureogenetic şi ciclul acizilor tricarboxilici este prezentată în fig. XI.2.

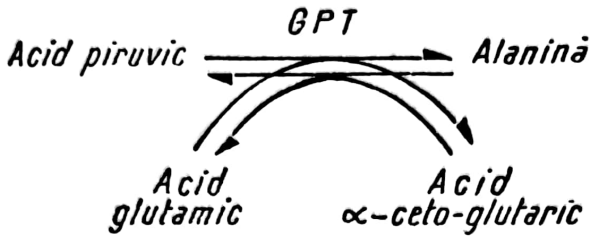
6. METABOLISMUL INDIVIDUAL AL AMINOACIZILOR

În această secţiune vor fi prezentate particularităţile metabolice ale aminoacizilor, atît în ceea ce priveşte biosinteza cît şi catabolismul scheletelor hidrocarbonate. De asemenea, vor fi arătate funcţiile specifice pe care majoritatea aminoacizilor le îndeplinesc în organism.

Scanned with OKEN Scanner

6.1. ALANINA

Aminoacid neesenţial, este obţinut din acid piruvic şi glutamat (donatorul de grupări aminice):

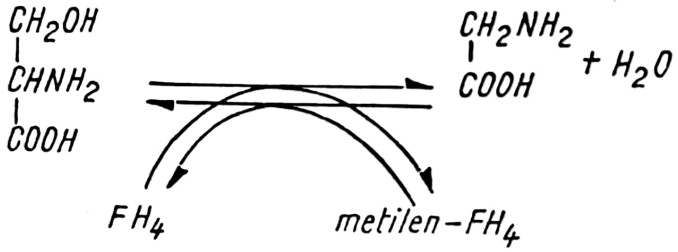


Catabolismul alaninei are loc prin inversarea reacţiei de mai sus, care este uşor reversibilă. Acidul piruvic este un metabolit situat la un punct de răscruce, el poate fi degradat oxidativ sau poate fi reconvertit în glucoză.

Pentru alanină, în afara rolului ei de component al proteinelor, nu sînt cunoscute alte funcţiuni.

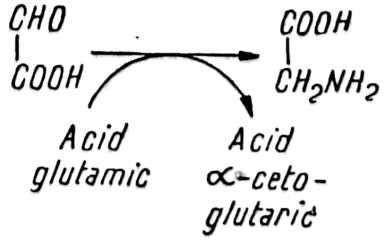
6.2. GLICOCOLUL (GLICINA)

Aminoacid neesenţial este sintetizat pe mai multe căi. Cea mai importantă modalitate de a obţine glicocolul porneşte de la un alt aminoacid neesenţial serina:



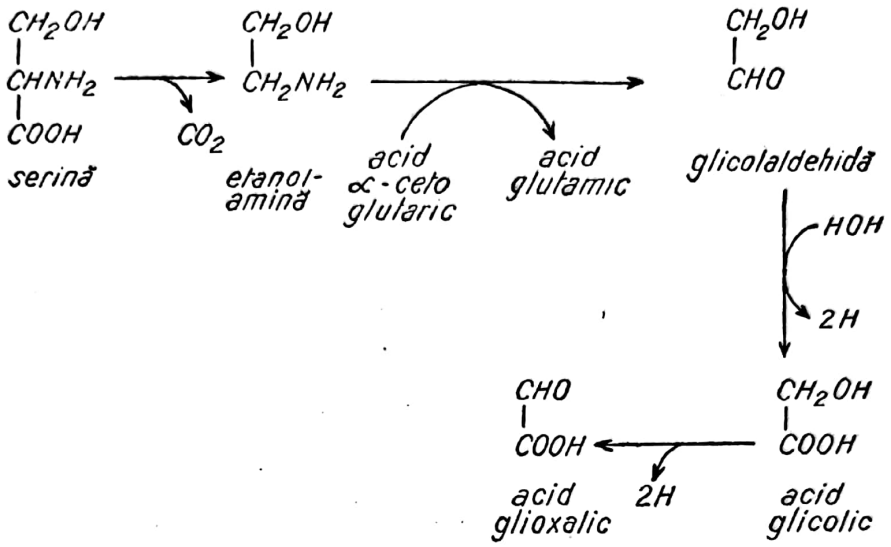
Sub acţiunea unei hidroximetil-transferaze, gruparea $-CH_2OH$ din serină este trecută pe acidul tetrahidrofolic (FH_4) sub formă de N^5, N^{10}-metilen-FH_4 (echivalent cu hidroximetil-FH_4) şi intră în fondul de grupări active cu un atom de carbon.

Cetoacidul corespunzător glicinei — acidul glioxalic (CHO—COOH) — prin transaminare formează aminoacidul:

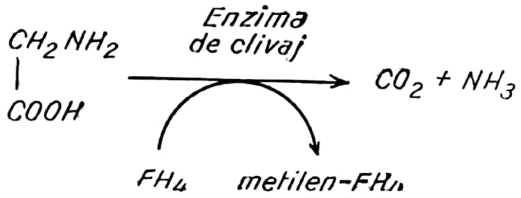


Scanned with OKEN Scanner

Trebuie menţionat că acidul glioxalic se obţine tot de la serină, prin reacţiile:

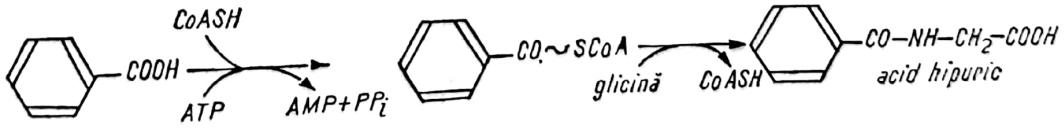


Glicocolul participă greu la reacţiile de transaminare. Calea principală de catabolizare constă într-o scindare a moleculei în CO_2, amoniac şi o grupare cu un atom de carbon preluată de acidul tetrahidrofolic sub forma de N^5, N^{10}-metilen-FH_4:



Glicocolul este un aminoacid care participă la multiple reacţii biosintetice, furnizînd atît atomi de carbon, cît şi atomi de azot. Cantităţi importante de glicină sînt utilizate pentru sinteza nucleului porfirinic din hemoglobină şi alte hemoproteine şi a celui purinic. Glicina împreună cu acidul glutamic şi cu cisteina intră în constituţia tripeptidului glutation (γ-glutamil-cisteinil-glicină). Un alt derivat al glicinei este şi creatina, compus ce joacă un rol important în metabolismul muşchilor (a se vedea sinteza creatinei la paragraful privind arginina).

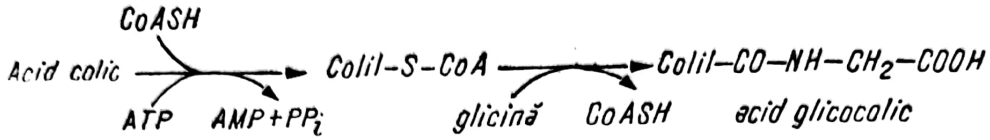
O altă funcţie a glicocolului este aceea de conjugare cu unii acizi carboxilici, metaboliţi normali sau de origine exogenă. Astfel, acidul benzoic este eliminat din organism sub forma amidei sale cu glicina (benzoil-glicină sau acid hipuric), compus uşor solubil, netoxic şi uşor excretabil pe cale renală:



Cantitatea de acid hipuric excretat într-un interval dat (4 ore) de la ingerarea unei doze test de benzoat de sodiu depinde de capacitatea funcţională a ficatului (testul acidului hipuric).

Scanned with OKEN Scanner

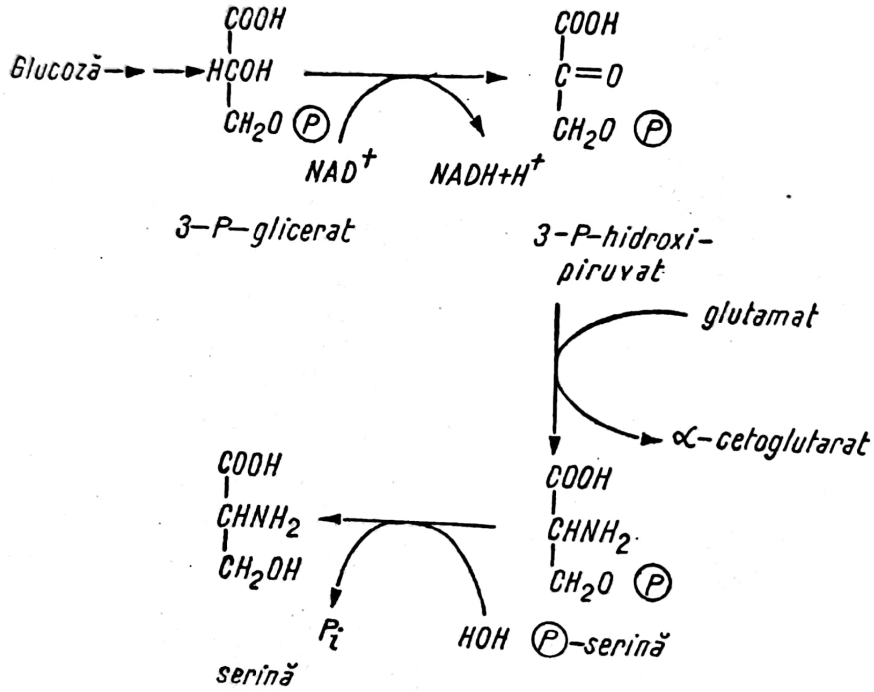
Glicina formează cu acizii biliari (primari sau secundari) amide — acizi biliari conjugaţi.



Conjugarea acizilor biliari, fie cu glicina, fie cu taurina, este o etapă obligatorie în vederea excreţiei lor prin bilă.

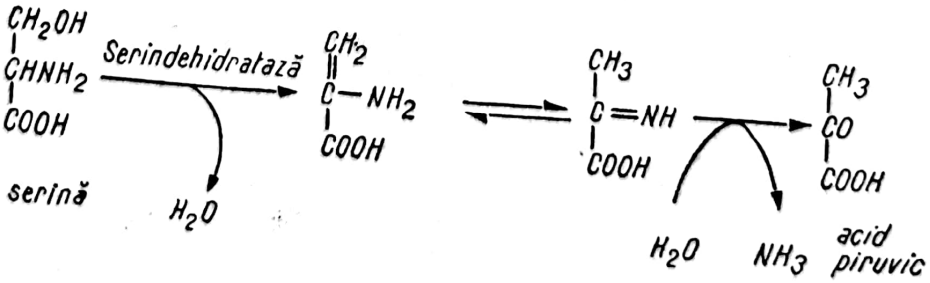
6.3. SERINA

Aminoacid neesenţial, este obţinut dintr-un intermediar al secvenţei glicolitice, din 3-fosfo-glicerat prin reacţiile:



Această sinteză joacă un rol important în conversia glucozei în aminoacizi, întrucît de la serină se obţin alţi doi aminoacizi neesenţiali, glicina şi cisteina.

Serina este degradată atît pe o cale proprie, în care se transformă în piruvat, sau după conversia sa în glicină urmează calea de catabolizare a acestui aminoacid. Serina este transformată în piruvat printr-o reacţie de deshidratare, piridoxal fosfat dependentă, care conduce imediat la un imino-derivat instabil ce pierde spontan amoniac:

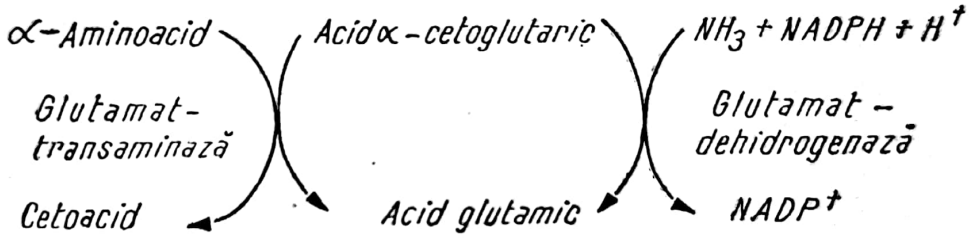


Interconversiunea serină⇌glicină este ușor reversibilă și ea permite pătrunderea Cα și Cβ din serină în fondul de grupări active cu un atom de carbon vehiculate de acidul tetrahidrofolic.

Serina îndeplinește în organism și funcții distincte de acelea de aminoacid. Serina este un component al fosfatidil-serinelor, fosfolipide relativ abundente în creier. Prin decarboxilare serina dă naștere la etanolamină component al altei categorii de fosfatide. De asemenea, prin transformarea restului de serină din fosfatidil-serine se obțin direct fosfatidil-etanolaminele, reacție deosebit de importantă în metabolismul fosfolipidelor. Serina furnizează o porțiune și din molecula sfingozinei, componentă a sfingolipidelor.

6.4. ACIDUL GLUTAMIC

Aminoacid neesențial, ceto-acidul corespunzător — acidul α-cetoglutaric — obținut din glucoză poate fi aminat prin transaminare cu diverși aminoacizi sau prin aminare reductivă sub acțiunea glutamat-dehidrogenazei:



Ambele reacții ocupă un loc central în metabolismul aminoacizilor și au fost examinate sub acest aspect mai sus. Reversibilitatea acestor reacții face ca ele să fie utilizate și în sens catabolic, acidul α-cetoglutaric, produs prin desaminarea acidului glutamic, fiind în continuare metabolizat în ciclul acizilor tricarbaxilici.

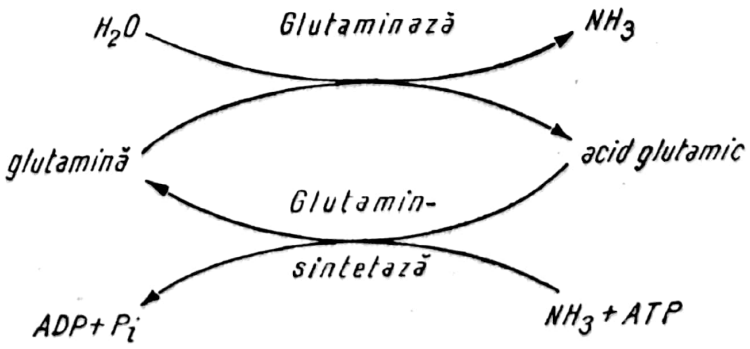
Acidul glutamic este precursorul altor aminoacizi neesențiali, prolina, arginina, glutamina. În creier, acidul glutamic suferă o decarboxilare piridoxal-fosfat dependentă în urma căreia se formează acid γ-aminobutiric (GABA):

$$HOOC-CH_2-CH_2-CHNH_2-COOH \rightarrow CO_2+HOOC-CH_2-CH_2-CH_2-NH_2$$

compus ce inhibă transmisia sinaptică avînd un rol reglator al funcției neuronale.

6.5. GLUTAMINA

Aminoacid neesențial. Interconversiunea glutamină⇌acid glutamic reprezintă nu numai calea de sinteză și de degradare a glutaminei, ea joacă totodată un rol important în metabolismul amoniacului:



Încorporarea amoniacului în glutamină reprezintă o cale de detoxifiere şi de transport al amoniacului. Hidroliza glutaminei la nivelul rinichiului produce amoniac care prin captarea unui proton contribuie la scăderea acidităţii plasmei şi prin excreţia ionului NH_4^+ în locul ionului Na^+ la conservarea acestui cation.

Gruparea amidică a glutaminei este utilizată la sinteza unor compuşi azotaţi ca purine (N_9 şi N_3), hexozamine.

6.6. ACIDUL ASPARTIC

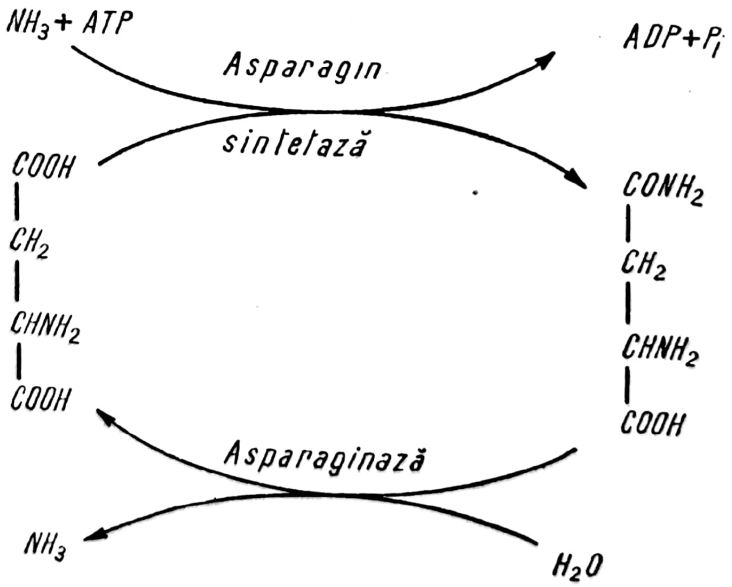
Aminoacidul neesenţial este obţinut din acid oxaloacetic prin transaminare cu glutamat:

$$\text{acid oxaloacetic} + \text{acid glutamic} \overset{\text{GOT}}{\rightleftharpoons} \text{acid aspartic} + \text{acid } \alpha\text{-cetoglutaric}$$

Reacţie uşor reversibilă, este totodată şi calea de degradare a acestui aminoacid. Gruparea aminică din acidul aspartic fiind deosebit de mobilă este utilizată ca sursă de azot în multe reacţii biosintetice. Acidul aspartic este donatorul imediat al unui atom de azot din molecula ureei. De asemenea, gruparea sa aminică este încorporată în nucleul purinic. În pirimidine acidul aspartic furnizează un atom de azot şi trei de carbon.

6.7. ASPARAGINA

Aminoacid neesenţial, se formează din acidul aspartic printr-o reacţie de amidare, ATP-dependentă (asparagin sintetază); degradarea are loc hidrolitic sub acţiunea unei asparaginaze:



La animale gruparea amidică a asparaginei are o utilizare metabolică mult mai redusă decît cea din glutamină. În schimb, la plante asparagina îndeplineşte funcţiile care revin glutaminei la animale.

Scanned with OKEN Scanner

6.8. PROLINA

Aminoacid neesențial, este sintetizat din acid glutamic prin reacțiile arătate în fig. XI.3. Parcurgerea în revers a acestei secvențe constituie calea de degradare a prolinei.

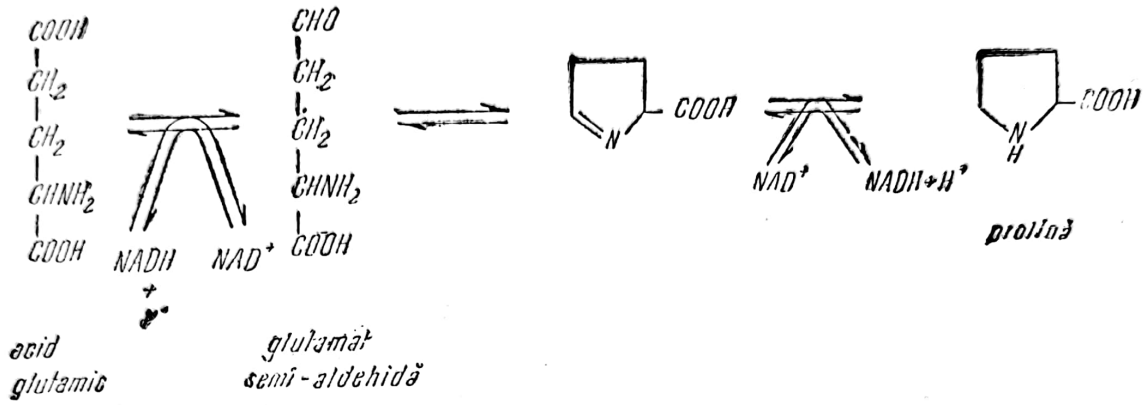
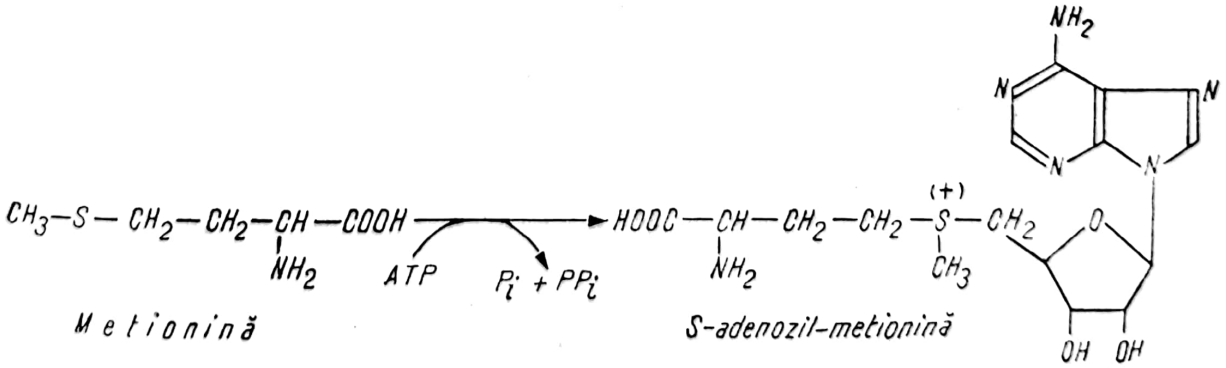


Fig. XI.3. Sinteza prolinei din acid glutamic.

Prolina este precursorul hidroxiprolinei, aminoacid care se întîlnește numai în constituția colagenelor, reprezentînd aproape jumătate din totalul resturilor aminoacidice ale acestui tip de proteină. Hidroxilarea prolinei are loc după încorporarea aminoacidului în lanțurile polipeptidice. Hidroxiprolina liberă nu poate fi utilizată la sinteza de colagen deoarece codul genetic nu cuprinde semnalul de încorporare a hidroxiprolinei în lanțuri peptidice. Concentrația hidroxiprolinei în țesuturi, plasmă sau urină reflectă intensitatea proceselor de degradare a colagenelor.

6.9. METIONINA

Aminoacid esențial, nu poate fi sintetizat în țesuturile animale. În toate reacțiile sale metabolice, metionina participă sub forma derivatului S-adenozil-metionină obținut din metionină și ATP:



Acest compus sulfonium (R_3S^+) cuprinde o grupare metil deosebit de mobilă care servește la diverse reacții de metilare: transformarea fosfatidil-etanol-

aminelor la fosfatidil-coline (lecitine), sinteza de creatină, metilarea noradrenalinei la adrenalină, metilarea bazelor azotate din acizii nucleici (ADN, ARN ribozomal și ARN de transfer). Participarea metioninei la sinteza hepatică a lecitinelor explică, într-o bună măsură, acțiunea lipotropă a acestui aminoacid și a proteinelor bogate în metionină. Lecitinele sînt componente structurale ale lipoproteinelor cu densitate foarte mică, forma în care sînt exportate grăsimile din ficat.

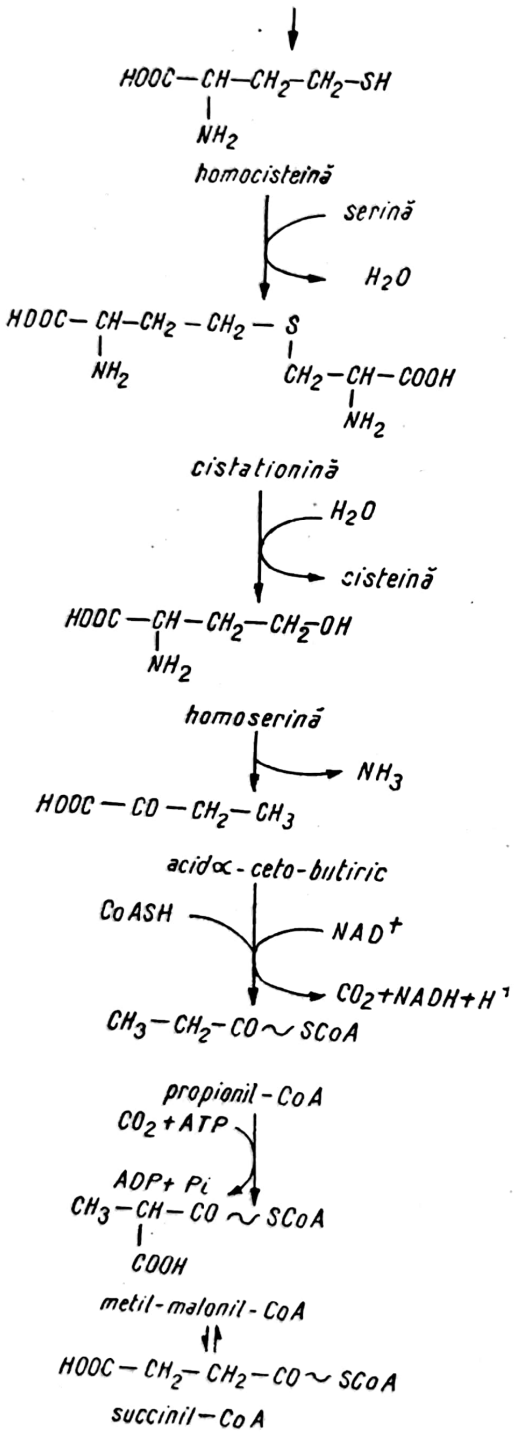


Fig. XI.4. Metabolismul S-adenozil-metioninei.

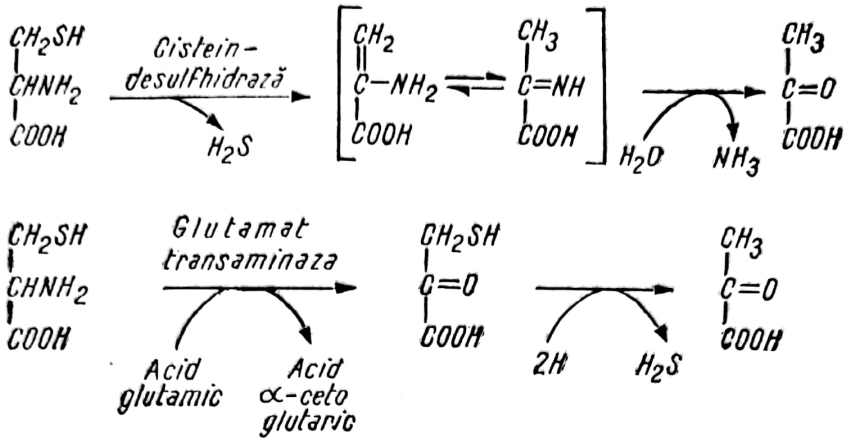
Prin cedarea grupării sale metil, S-adenozil metionina devine S-adenozil-homocisteină, iar aceasta mai departe prin hidroliză eliberează homocisteină, omologul superior al cisteinei. Reacțiile următoare constituie pe de o parte, calea de biosinteză a cisteinei, iar pe de alta, o cale de catabolizare a metioninei. Homocisteina se condensează cu serina pentru a forma un tioeter mixt — cistationina — care prin scindare hidrolitică dă naștere la cisteină și homoserină. Homoserina, ce cuprinde scheletul hidrocarbonat al metioninei, prin desaminare (sub acțiunea unei dehidrataze) și apoi decarboxilare oxidativă a cetoacidului dă naștere la propionil-CoA și în final la succinil-CoA.

6.10. CISTEINA

Aminoacid neesențial. Este obținut pornindu-se de la metionină (esențială) care îi furnizează gruparea tiolică și din serină (neesențială) — fig. XI.4.

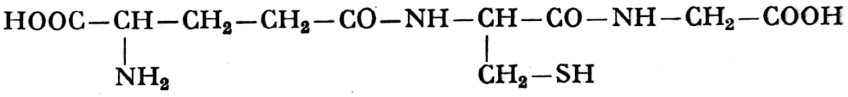
Prin desaminare și desulfurare cisteina dă naștere la acid piruvic. Pe o cale de degradare (a) desulfurarea precede pierderea grupării aminice; în secvența (b) reacția ce inițiază catabolismul este transaminarea:

Scanned with OKEN Scanner

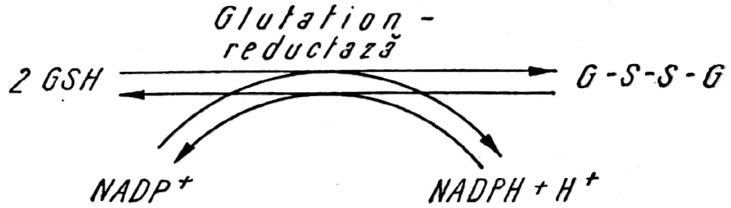


Cisteina este precursorul altor compuși tiolici din organism. În primul rînd, cisteina furnizează porțiunea cuprinzînd gruparea —SH din coenzima A și din fosfopanteteină. Din cisteină prin oxidare și decarboxilare se obține taurina ($H_2N—CH_2—CH_2—SO_3H$) care formează (alături de glicină) conjugați cu acizii biliari, cum este de exemplu acidul taurocolic (colil-NH—CH_2—CH_2—SO_3H).

Cisteina împreună cu acidul glutamic și glicina formează tripeptidul glutation (γ-glutamil-cisteinil-glicină, GSH):



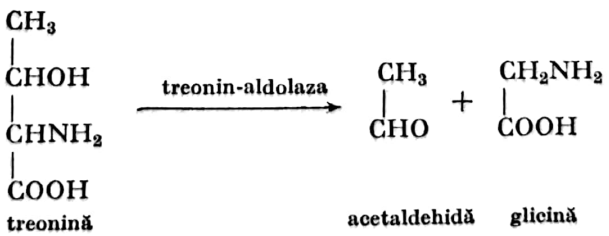
Prin gruparea tiolică glutationul se oxidează ușor și reversibil la disulfură (glutation oxidat, G—S—S—G):



Raportul GSH/GSSG este dependent la rîndul lui de gradul de oxidare a NADP-ului (de raportul $NADP^+$/NADPH) astfel încît glutationul participă, împreună cu alte sisteme, la reglarea potențialului oxido-reducător al țesuturilor.

6.11. TREONINA

Aminoacid esențial. Este catabolizată la acetaldehidă și glicină printr-o reacție de retroaldolizare:



Glicina este catabolizată mai departe pe căile proprii ale acestui aminoacid și în acest fel azotul din treonină intră în fondul metabolic comun (treonina

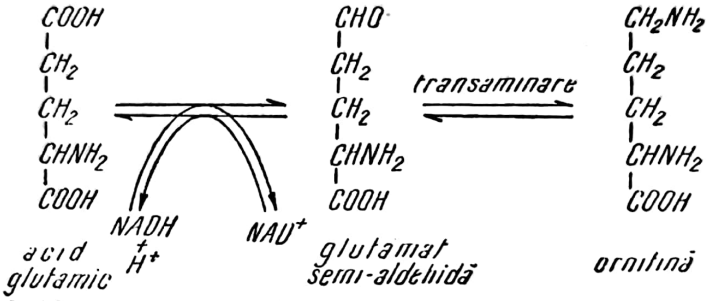
Scanned with OKEN Scanner

nu participă direct la reacţiile de transaminare). Acetaldehida după oxidare şi activare formează acetil-CoA.

Pentru treonină nu se cunosc alte funcţii afară de aceea de constituent al proteinelor. Resturile de treonină, ca şi acelea de serină, în unele proteine şi fosfoproteine sînt esterificate cu acid fosforic.

6.12. ARGININA

Aminoacid neesenţial, prezenţa sa este indispensabilă în raţie numai în perioada de creştere. Este sintetizată din ornitină prin reacţii comune cu acelea ale ciclului ureo-genetic (fig. XI.1.). Ornitina la rîndul ei este obţinută din acid glutamic:



Viteza redusă de formare a ornitinei limitează ritmul sintezei de arginină şi la copii nevoile în acest aminoacid trebuie parţial acoperite prin aport exogen.

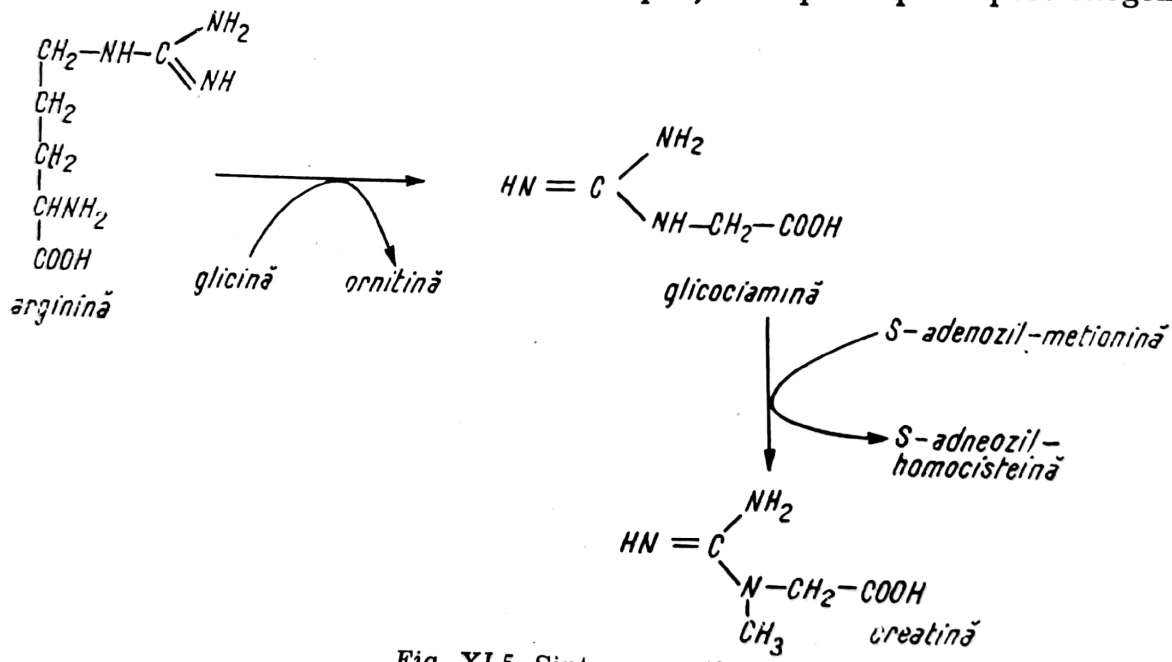
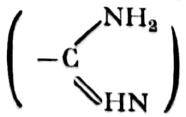


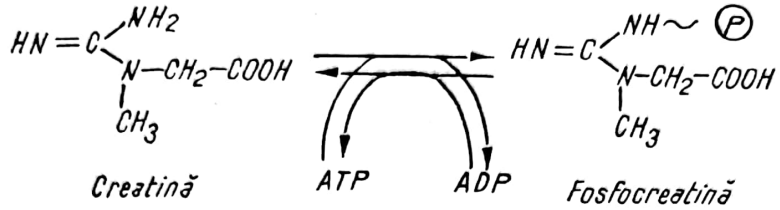
Fig. XI.5. Sinteza creatinei.

Catabolismul argininei are loc, via ornitină, prin reacţiile de mai sus uşor reversibile. Ornitina rezultă din arginină sub acţiunea arginazei. În această reacţie se formează şi ureea.

Arginina împreună cu glicina dau naştere la creatină, compus ce joacă roluri importante în metabolismul energetic al muşchilor (fig. XI.5). Sub acţiunea unei transferaze, gruparea amidinică:



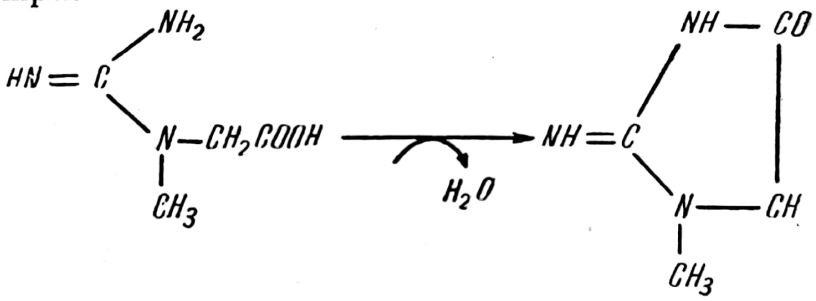
a argininei este transferată pe glicină, rezultînd acidul guanidin-acetic (glicociamină), care prin metilare formează creatina. Cea mai mare parte din creatină se află în mușchii scheletici. La concentrații ridicate de ATP creatina este fosforilată la fosfocreatină. Valoarea $\Delta G^{\circ\prime}$ pentru fosfocreatină (—10,3 Kcal) arată că acest compus nu se poate obține decît în prezența unui mare exces de ATP. Fosfocreatina cedează cu ușurință ADP-ului restul fosforil rezultînd ATP:



Creatină *Fosfocreatină*

În mușchi, în perioadele de repaus are loc sinteza de creatină, pe cînd în cazul unei solicitări prin conversia fosfocreatină → creatină se poate obține rapid o cantitate oarecare de ATP, pînă la intrarea în funcțiune a glicolizei și a fosforilărilor oxidative.

Din creatină prin anhidrizare se obține creatinina, forma de excreție a acestui compus:



Creatină *Creatinină*

Creatina este un component prezent aproape în totalitate în mușchi și cantitatea de creatinină formată depinde de masa musculară totală. În condiții fiziologice creatinina este componentul azotat al sîngelui cel mai puțin variabil (0,7—1,2 mg/100 ml, la bărbați și 0,5—1,0 mg/100 ml, la femei). De asemenea, cantitatea de creatinină excretată în 24 ore pentru 1 g de greutate corporală este constantă la un același individ și poartă numele de coeficient de creatinină (20—26 mg la bărbați și 14—22 mg la femei).

6.13. LIZINA

Aminoacid esențial. Degradarea sa la mamifere nu este elucidată complet, lizina nu participă la reacțiile de transaminare.

Derivatul ei hidroxilat (5-hidroxilizina) este un component specific al colagenelor și se formează prin hidroxilarea resturilor de lizină din lanțurile polipeptidice în curs de formare.

6.14. LEUCINA, VALINA ȘI IZOLEUCINA

Acești trei aminoacizi esențiali cuprind la Cα un rest hidrocarbonat cu catenă ramificată și reacțiile lor inițiale de degradare sînt asemănătoare. După transaminare cetoacizii suferă decarboxilări oxidative dînd naștere la derivați acil-CoA cu un carbon mai puțin. Din valină se obține izobutiril-CoA, din leucină izovaleril-CoA iar din izoleucină metil-butiril-CoA (fig. XI.6).

Scanned with OKEN Scanner

Aceşti acizi suferă apoi unele reacţii ale β-oxidării acizilor graşi şi altele auxiliare dînd naştere în cele din urmă la succinil-CoA (valina şi izoleucina) şi la acetil-CoA şi acid acetoacetic (leucina). Leucina este singurul aminoacid care nu participă cu nici unul din atomii săi de carbon la gluconeogeneză. Acidul acetoacetic este un corp cetonic iar acetil-CoA dacă nu este degradată oxidativ sau transformată în grăsimi este potenţial cetogenă.

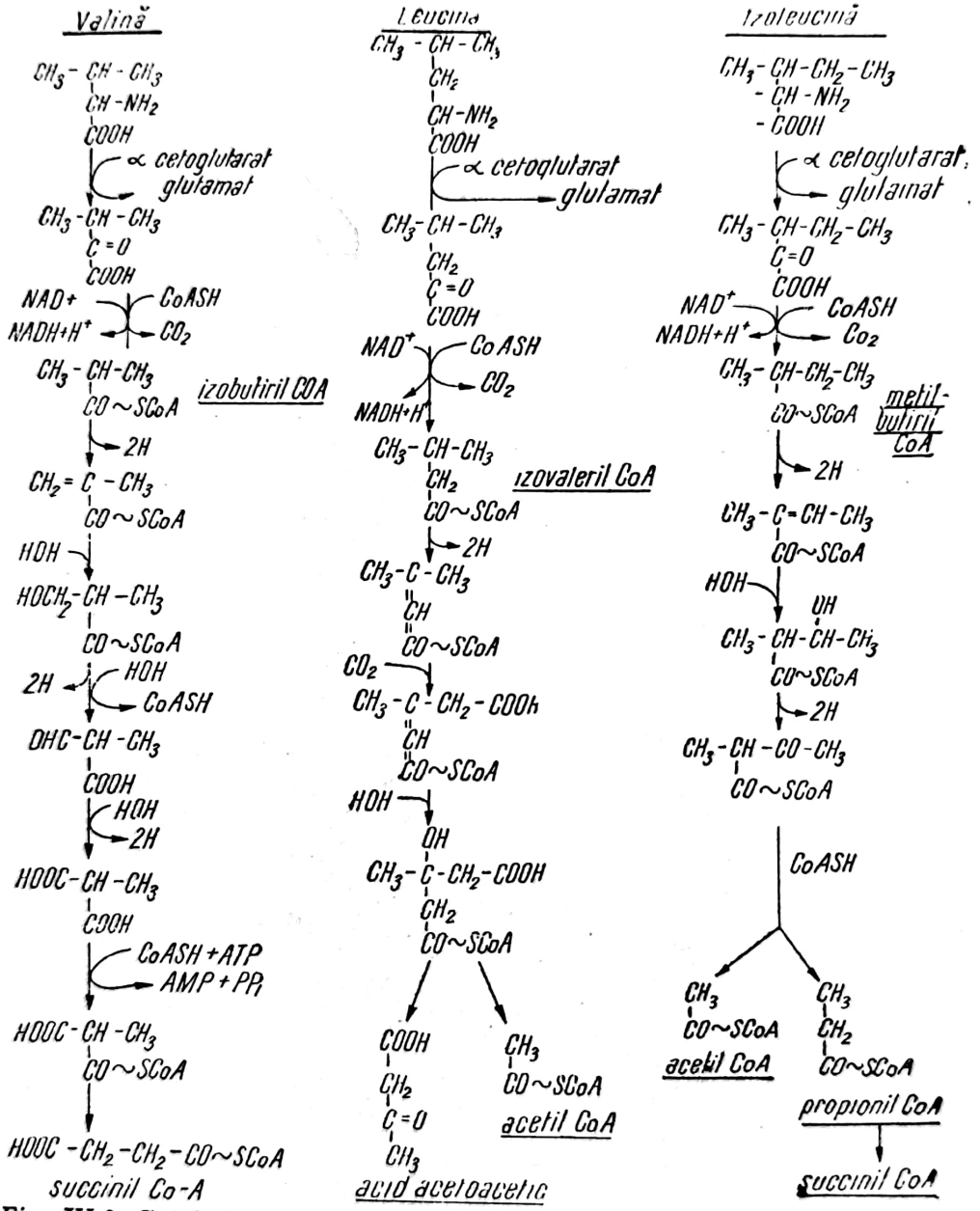


Fig. XI.6. Catabolismul aminoacizilor cu catenă ramificată (valina, leucina, izoleucina).

6.15. TIROZINA

Aminoacid neesenţial, poate fi obţinut din fenilalanină (esenţială) prin hidroxilare (fig. XI.8).

Catabolismul tirozinei (fig. XI.7) conduce la acid acetoacetic (un corp cetonic) şi la acid fumaric. O etapă importantă a acestei secvenţe este deschi-

derea nucleului aromatic catalizată de o oxidază (homogentizat oxidaza). Absența acestei enzime la unii subiecți determină acumularea tisulară a acidului homogentizic și excreția sa prin urină. Urina acestor persoane în contact cu aerul se înnegrește ca urmare a oxidării acidului homogentizic la coloranți chinonici. Această tulburare metabolică — descrisă încă din secolul al XVIII-lea — a primit denumirea de alcaptonurie, de la alcapton, numele

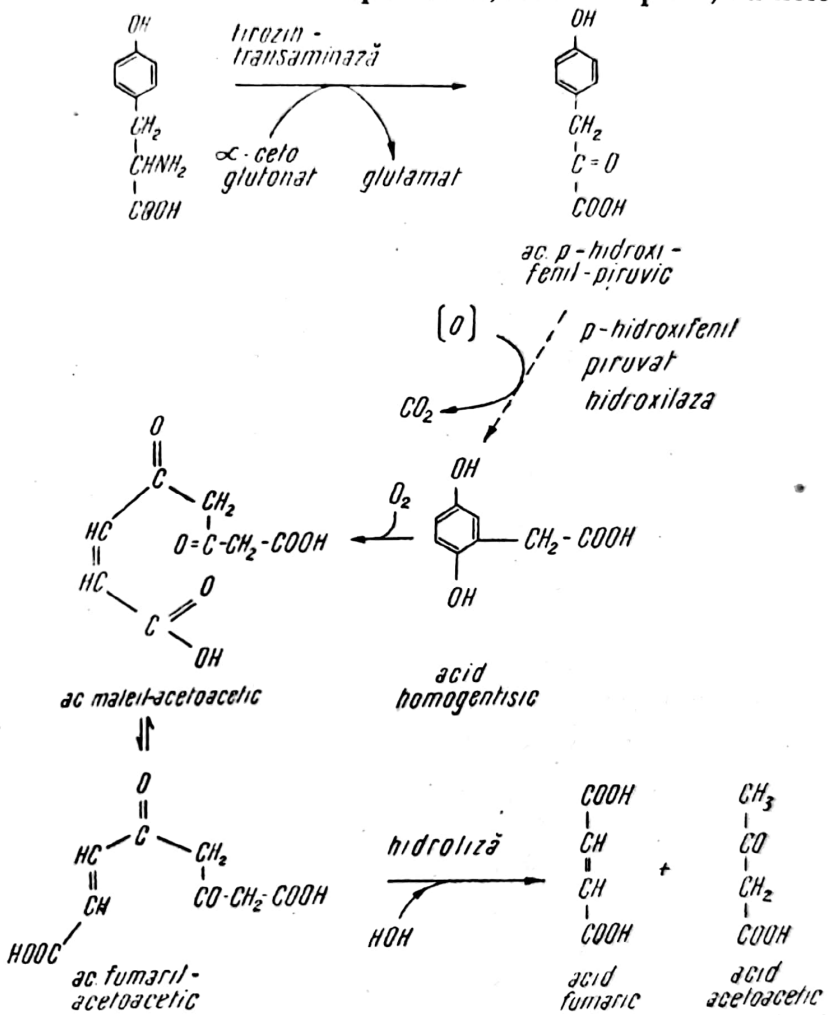


Fig. XI.7. Catabolismul tirozinei.

atribuit substanței (acid homogentizic) răspunzătoare de înnegrirea urinei. Alcaptonuria este o boală metabolică rară și nu prezintă manifestări clinice pînă la 30—40 ani. Începînd de la această vîrstă acidul homogentizic acumulat în țesuturile conjunctive determină dureri artritice.

Tirozina este precursorul pigmenților melaninici care dau culoarea părului, a pielii și a irisului. În legătură cu această utilizare a tirozinei este cunoscută maladia metabolică — albinism — determinată de deficiența organismului în echipamentul enzimatic necesar transformării tirozinei în melanine. Subiecții cu această tară au părul și pielea decolorate.

De la tirozină se sintetizează catecolaminele și hormonii tiroidieni (a se vedea Cap. XIII).

6.16. FENILALANINA

Aminoacid esențial. Prin hidroxilare dă naștere la tirozină (fig. XI.8). Prin urmare, aportul exogen de fenilalanină trebuie să acopere, atît necesarul de fenilalanină, cît și pe cel de tirozină. Transformarea în tirozină reprezintă

totodată şi calea principală de catabolizare a fenilalaninei, acest aminoacid nu are o cale proprie de degradare.

Hidroxilarea fenilalaninei la tirozină este catalizată de o enzimă hepatică specifică (fig. XI.8).

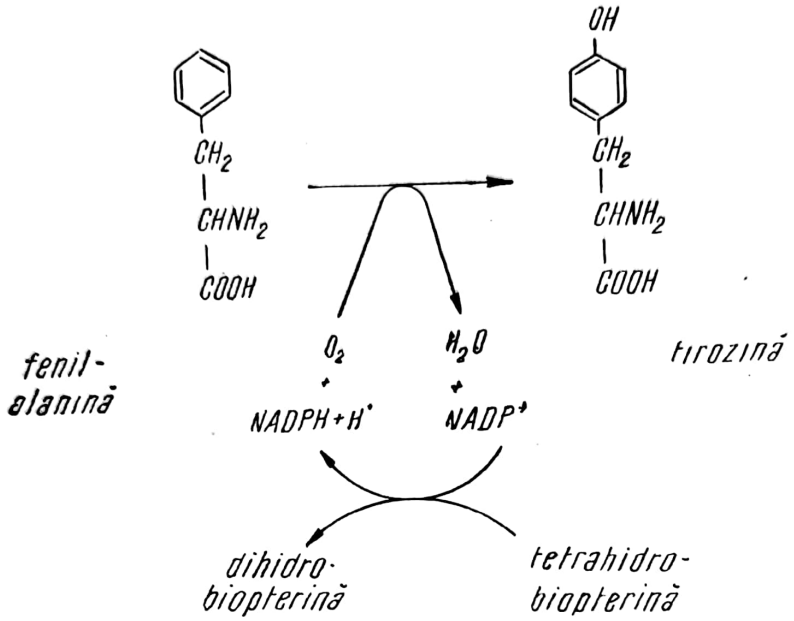
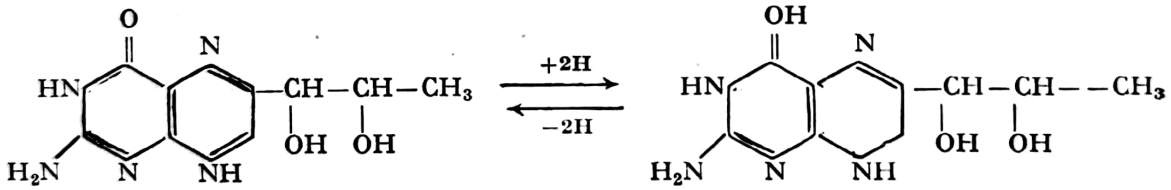


Fig. XI.8. Transformarea fenilalaninei în tirozină.

La această reacţie participă un compus înrudit cu acidul folic — biopterina — care prin transformarea tetrahidrobiopterină⇌dihidrobiopterină alimentează cu echivalenţi reducători această hidroxilază.



dihidrobiopterină — tetrahidrobiopterină

Deficienţa sistemului enzimatic de hidroxilare a fenilalaninei determină una din cele mai răspîndite maladii metabolice, fenilcetonuria. Aproximativ 1,5% din totalul deficienţelor mintale sînt datorate acestei tulburări. Prin blocarea căii de transformare a fenilalaninei în tirozină, fenilalanina se acumulează în organism şi creşterea concentraţiei sale plasmatice este semnul cel mai precoce al maladiei. La niveluri tisulare ridicate de fenilalanină devin operante căi de degradare care în mod normal nu sînt urmate de acest aminoacid (fig. XI.9). Fenilalanina prin transaminare dă naştere la acid fenil-piruvic (un compus fenil-cetonic) care mai departe prin decarboxilare oxidativă formează acidul fenil-acetic, iar prin dehidrogenare acidul fenil-lactic. Aceşti metaboliţi se elimină prin urină (acidul fenil-acetic sub formă de conjugat cu glutamina). Acidul fenil piruvic a dat numele acestei tulburări de fenilcetonurie. Prezenţa sa în urină poate fi detectată printr-o reacţie de culoare cu $FeCl_3$.

Feniłalanina şi metaboliţii ei care se acumulează în organismul fenilcetonuricilor determină leziuni ireversibile ale sistemului nervos, deficienţe

mintale. La bolnavii cu fenilcetonurie s-au observat adesea și tulburări ale metabolismului triptofanului. Se crede că fenilalanina prezentă în țesuturi în concentrație mai mare inhibă hidroxilarea triptofanului și sinteza serotoninei. În acest fel s-ar putea explica deficiențele mintale ale fenilcetonuri-

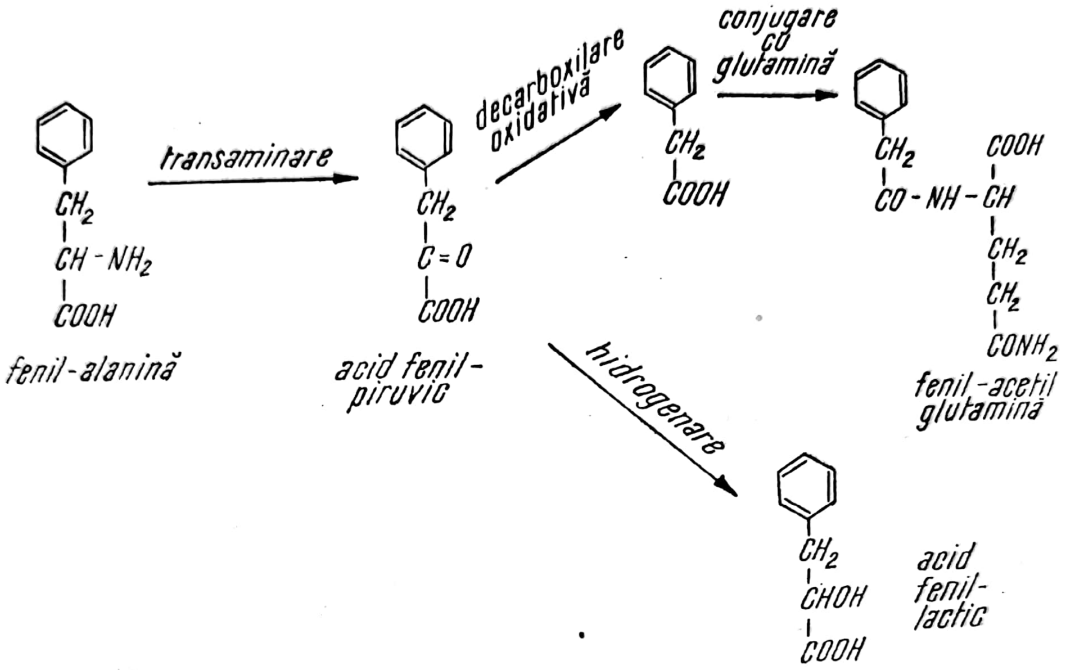


Fig. XI.9. Degradarea fenilalaninei la fenilcetonurici.

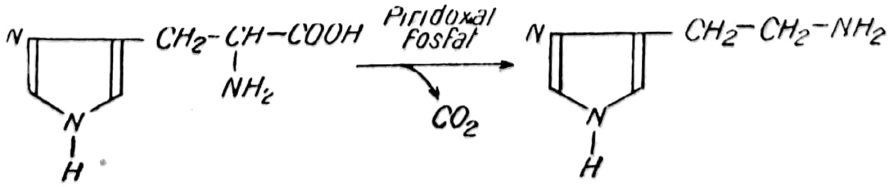
cilor. De asemenea, s-a mai constatat că la unii bolnavi cu fenilcetonurie este defectuoasă sinteza pigmenților melaninici, probabil printr-o competiție între fenilalanină și tirozina (exogenă) pentru unele sisteme enzimatice.

6.17. HISTIDINA

Indispensabilitatea în rație a acestui aminoacid a fost demonstrată pentru șobolan și pentru mamiferele superioare în creștere. Pentru omul adult este considerat neesențial dar nu s-a putut stabili calea de sinteză. Probabil că histidina este de fapt esențială și pentru adult, dar nevoile fiind mici, în experiențele de scurtă durată efectuate pe voluntari, nu s-au putut constata tulburări datorate absenței aminoacidului în rație.

Catabolismul histidinei este arătat în fig. XI.10. În legătură cu această degradare trebuie remarcată formarea unei grupări active cu un atom de carbon, N^5-formimino-FH_4.

Histidina este precursorul histaminei:



Histidina intră în constituţia dipeptidului carnosină (histidil-alanină) şi a derivatului ei metilat anserina (1-metil-histidil-alanină) prezente în muşchii scheletici. Nu se cunosc însă funcţiile acestor substanţe.

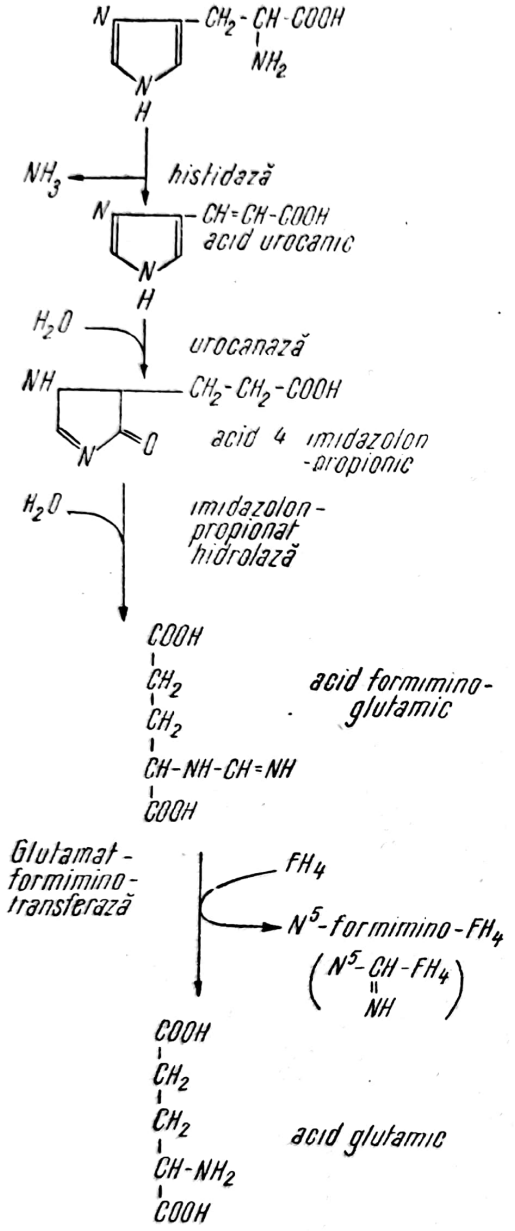


Fig. XI.10. Catabolismul histidinei.

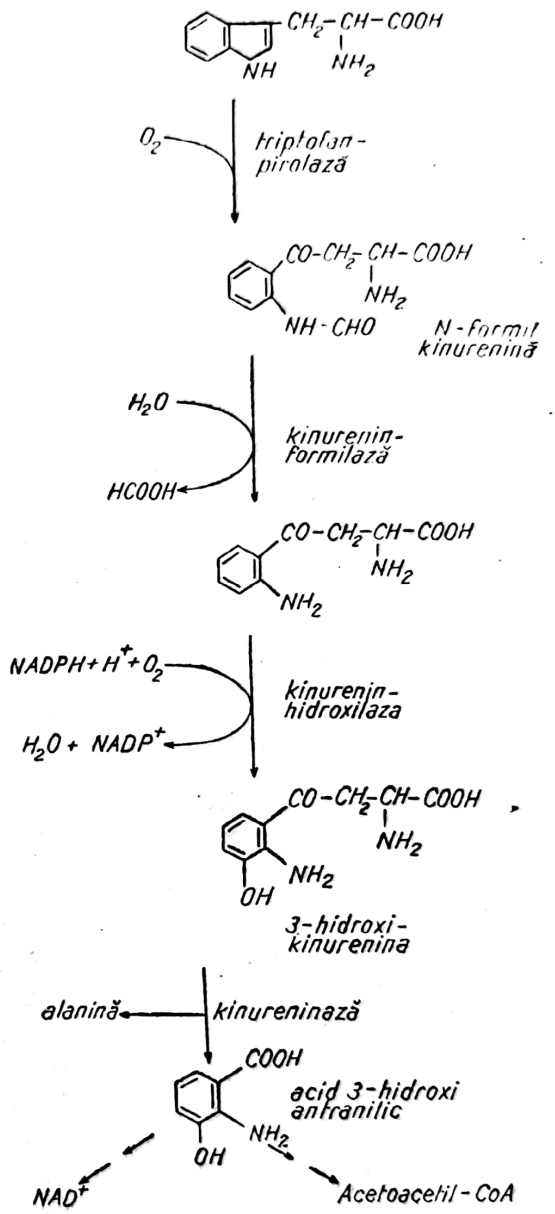


Fig. XI.11. Catabolismul triptofanului.

6.18. TRIPTOFANUL

Aminoacid esenţial. Este unul dintre aminoacizii mai puţin răspîndiţi. Calea sa majoră de degradare conduce la acetoacetil-CoA prin ruperea nucleului indolic (fig. XI.11). Este important de menţionat că pornindu-se de la un catabolit intermediar — acidul 3-hidroxi-antranilic — se obţine vitamina PP (sub formă de NAD). Această reacţie face posibilă înlocuirea parţială în raţie a vitaminei PP prin triptofan. Se estimează că la om 1 mg vitamină PP este obţinută prin metabolizarea a 60 mg triptofan.

Scanned with OKEN Scanner

O transformare metabolică importantă a triptofanului este conversia sa în serotonină (5-hidroxi-triptamină) (fig. XI.12). Sub acțiunea unei hidroxilaze specifice se obține mai întîi 5-hidroxi-triptofan care apoi este decarboxilat de o enzimă piridoxal-fosfat dependentă. Serotonina se formează în multe țesuturi. Cantități mai mari se află în creier, intestin, în plachetele sanguine. Are acțiune vasoconstrictoare și stimulează musculatura netedă. La nivelul creierului reglează activitatea nervoasă superioară.

Celulele intestinale care sintetizează serotonina — celule argentafine — pot suferi o dezvoltare malignă (carcinoid sau argentafinom) și în aceste cazuri, cantități apreciabile de triptofan sînt transformate în serotonină. Tulburarea este caracterizată prin diaree profusă datorită acțiunii stimulatoare a serotoninei asupra musculaturii netede a peretelui intestinal.

Catabolismul serotoninei conduce la formare de compuși indolici excretați sub formă de sulfo- și glucurono-conjugați (fig. XI.12). În colon triptofanul neabsorbit suferă acțiunea enzimelor bacteriene dînd naștere la acid indolacetic care este absorbit și apoi excretat prin urină, conjugat cu acidul glucuronic sau sulfuric. În sindromul Hartnup, datorită unei absorbții defectuoase, cantități mari de triptofan sînt expuse acțiunii florei microbiene, ceea ce duce la formarea și excreția excesivă de compuși indolici.

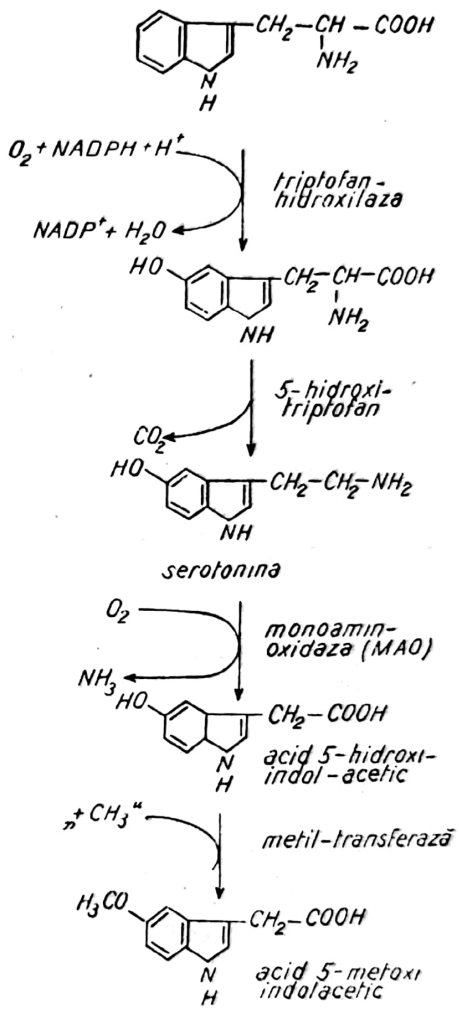


Fig. XI.12. Sinteza și catabolismul serotoninei.

7. INTERRELAȚII ÎNTRE METABOLISMUL GLUCIDELOR, LIPIDELOR ȘI AL PROTEINELOR

Reînnoirea permanentă, mai lentă sau mai rapidă, a componenților celulari și îndeplinirea funcțiilor specifice necesită aprovizionarea continuă a celulelor cu substrate energetice și plastice. Datorită alimentării intermitente aportul exogen de substrate este discontinuu, ceea ce impune funcționarea unor dispozitive de reglare care să niveleze deviațiile în aprovizionarea cu alimente, atît sub aspectul calității, cît și al cantității lor. Substratele energetice majore — glucoza, acizii grași și aminoacizii — se află ca atare în sînge și sînt depozitate în forme macromoleculare în anume țesuturi. Cifrele din tabelul XI.5 arată importanța cantitativă a rezervelor calorice ale unui organism. Substratele energetice aflate în circulație (presupunîndu-se

Tabelul XI.5

Rezervele calorice ale organismului (adult normal de 70 kg)

Component	Kcal	Durata de acoperire a nevoilor bazale (72 Kcal/oră)
Glucoza din lichidul extracelular	80	1 oră
Acizi graşi liberi plasmatici	3	2,5 minute
Trigliceride plasmatice	30	25 minute
Trigliceride în ţesutul adipos	141 000	81 zile
Proteine, în special cele din muşchi	24 000	14 zile
Glicogen muscular	600	8 ore
Glicogen hepatic	300	4 ore

că ele nu sînt înlocuite) pot acoperi nevoile bazale pentru perioade foarte scurte. Dacă organismul ar consuma un singur component, glucoza ar fi suficientă pentru o oră, trigliceridele plasmatice pentru 25 de minute, iar acizii graşi pentru 2,5 minute. Aminoacizii plasmatici din punct de vedere energetic sînt practic neglijabili. Rezervele calorice tisulare sînt însă foarte mari, putînd asigura supravieţuirea fără aport alimentar timp de cîteva luni. Trigliceridele din ţesutul adipos reprezintă cel mai bogat depozit energetic, după care urmează proteinele musculare şi cele hepatice. Glicogenul hepatic şi muscular, cantitativ, au o pondere redusă ca rezervă energetică a organismului.

Alternanţa perioadelor de alimentare cu acelea de post sau trecerea de la consumul energetic bazal, de întreţinere, la o activitate intensă determină ample fluctuaţii metabolice, trecerea de la reacţii predominant biosintetice, anabolice, la reacţii de degradare, catabolice. Transformările materialelor energogene pot fi examinate luîndu-se în consideraţie aceste două faze metabolice: una anabolică şi cealaltă catabolică. Faza anabolică corespunde pătrunderii în organism a produselor de digestie a alimentelor. Afluxul de substrate energetice depăşeşte consumul şi excesul este depozitat. Organismul se află în faza catabolică în perioadele obişnuite, mai lungi sau mai scurte, dintre mese, cînd aportul exogen este întrerupt; exerciţiile fizice intense şi de lungă durată, ca şi foamea prelungită intensifică foarte mult reacţiile catabolice degradative.

Faza anabolică a metabolismului este dominată de creşterea nivelurilor plasmatice ale unor componenţi prin absorbţia lor din tractul gastro-intestinal. În această etapă glucoza, aminoacizii şi trigliceridele (sub formă de chilomicroni şi lipoproteine cu densitate foarte mică) se află în sînge în concentraţii mari. Hipoglicemia şi hormonii eliberaţi de tractul gastro-intestinal declanşează riposta insulinică care favorizează utilizarea intracelulară a glucozei şi a aminoacizilor în ţesuturile insulino-sensibile. Trigliceridele circulante sînt şi ele epurate rapid prin comutarea lipoproteino-lipazei din ţesutul adipos de la o formă inactivă la alta cu activitate catalitică mai mare.

Trecerea de la catabolism la anabolism şi viceversa declanşează perturbaţii metabolice în special în ficat, în muşchi scheletici şi în ţesutul adipos, organe care joacă roluri principale în depozitarea şi mobilizarea rezervelor energetice ale organismului. Creierul şi hematiile, din contră, au un consum energetic constant. Consumul de glucoză în creier este de 120 g/zi, ceea ce reprezintă aproximativ 25% din consumul caloric al unui adult în repaus. Nevoia de energie a creierului este invariabilă, nu depinde de intensitatea

Scanned with OKEN Scanner

activității nervoase; somnul nu scade consumul energetic al creierului decît cu 3—5%. Masa eritrocitară consumă aproximativ 36 g glucoză pe zi.

Ficatul în faza anabolică captează glucoză din sînge. Glicemia atinge în timpul absorbției niveluri de 120—130 mg/ml. Afluxul de glucoză în ficat este accelerat prin creșterea activității glucokinazei, care se adaugă nivelului de bază al hexokinazei. Glucoza fosforilată la glucozo-6-fosfat crește debitul tuturor secvențelor care sînt inițiate de acest compus: se intensifică arderea glucozei la bioxid de carbon și apă; se reface depozitul de glicogen; glucoza care prisosește peste aceste nevoi, limitate de morfologia și funcționalitatea țesutului, este convertită în trigliceride care sînt exportate sub formă de lipoproteine cu densitate foarte mică spre țesuturile extrahepatice, spre țesutul adipos în special. Aminoacidemia crescută prin absorbție intestinală furnizează ficatului substrate pentru resinteza proteinelor dislocate în faza catabolică. O parte din glucoză poate fi convertită în aminoacizi, dacă ratia alimentară cuprinde proteine puține sau de calitate inferioară.

Mușchii scheletici insulino-sensibili captează cu ușurință glucoză și aminoacizi din lichidul extracelular. În această fază se reface rezerva de glicogen și se resintetizează proteinele tisulare. Trigliceridele circulante din chilomicroni și din lipoproteinele cu densitate foarte mică furnizează mușchilor acizi grași care sînt depozitați ca trigliceride tisulare.

În faza anabolică metabolismul țesutului adipos este deplasat spre lipogeneză. Capacitatea sa de depozitare este nelimitată, astfel încît substratele energetice — glucoza și acizii grași — care nu au putut fi păstrate în alte forme, sînt depozitate în țesutul adipos ca trigliceride. Insulinemia crescută facilitează pătrunderea intracelulară a glucozei care furnizează glicerol-fosfat iar lipoproteino-lipaza activă permite hidroliza trigliceridelor circulante și utilizarea acizilor grași.

Prin urmare, faza anabolică a metabolismului este caracterizată prin depozitarea excesului de substanțe energogene sub formă de glicogen, de proteine și de trigliceride. Insulina este factorul hormonal predominant.

Faza catabolică. În intervalele dintre mese, pentru a-și asigura homeostazia substratelor energetice în lichidele extracelulare, organismul face apel la rezervele sale calorice. Efectuarea de exerciții fizice sau răspunsul adaptativ la diverși factori agresivi crește consumul caloric cu mult peste nivelul bazal. În faza catabolică sînt puse în joc mecanisme reglatoare complexe, atît metabolice cît și neuro-hormonale, care permit mobilizarea gradată a rezervelor, utilizarea preferențială a unui substrat în locul altuia ce trebuie cruțat. Rezervele de glucide, lipide și de proteine sînt arse în proporții și cu viteze diferite după durata și intensitatea solicitării organismului.

Cerința majoră a fazei catabolice este asigurarea homeostaziei glicemice. Un anumit nivel al glicemiei este indispensabil pentru funcționarea sistemului nervos central și a hematiilor, țesuturi strict dependente de glucoza sanguină. O altă cerință este aprovizionarea tuturor celorlalte țesuturi cu substrate pentru îndeplinirea activității lor specifice. Substratele energetice oferite acestor țesuturi sînt: glucoză, acizi grași, corpi cetonici, aminoacizi. Tendința spre hipoglicemie caracteristică acestei faze a metabolismului duce la scăderea debitului insulinic și la o utilizare periferică redusă a glucozei. Glucagonul, catecolaminele și glucocorticoizii sînt principalii hormoni care coordonează reacțiile de mobilizare a rezervelor energetice.

Scanned with OKEN Scanner

Ţesutul adipos, ca depozit caloric principal, joacă un rol cheie în furnizarea de substrate energogene. În faza catabolică activitatea liproteino-lipazei este redusă şi ţesutul adipos este inapt de a utiliza trigliceridele circulante din lipoproteinele cu densitate foarte mică (puse în circulaţie de ficat). Lipoliza este accelerată, pe de o parte prin deficit de glicerol-fosfat (rezultat al hipoglicemiei şi hipoinsulinemiei) şi pe de altă parte, prin eliberarea de adrenalină şi de glucagon care activează trigliceridо-lipaza. În aceste condiţii ţesutul adipos trimite în circulaţie acizi graşi care sînt utilizaţi de ţesuturi ca material energogen (fac excepţie creierul şi hematiile); glicerolul din circulaţie este captat de ficat devenind material pentru sinteza de glucoză.

Muşchii scheletici în faza catabolică, hipoinsulinemică, captează cantităţi mici de glucoză din sînge. Nevoile sale energetice sînt împlinite într-o primă etapă prin dislocarea glicogenului. Resturile de glucoză sînt arse la bioxid de carbon şi apă sau sînt degradate anaerob la acid lactic. Acizii graşi obţinuţi din trigliceridele tisulare, din trigliceridele plasmatice (ca lipoproteine cu densitate foarte mică) sau din fracţiunea acizi graşi liberi plasmatici sînt suportul energetic major al muşchilor scheletici în activitate. Corpii cetonici pe care ficatul îi pune în circulaţie în faza catabolică sînt şi ei utilizaţi cu viteză mare în muşchi.

După epuizarea rezervelor de glicogen (hepatic şi muscular) organismul recurge la proteinele musculare pentru a obţine material gluconeogenetic. Glucocorticoizii determină dislocarea proteinelor şi aminoacizii sînt convertiţi la nivelul ficatului în glucoză. Aceasta este calea principală de menţinere a homeostaziei glicemice în foame.

Funcţia determinantă a ficatului în faza catabolică este producţia de glucoză pentru a menţine glicemia la un nivel compatibil cu supravieţuirea. Substratele gluconeogenetice sînt în primul rînd aminoacizii obţinuţi prin degradarea proteinelor proprii şi a celor din muşchi. Glicerolul format în ţesutul adipos prin lipoliză joacă un rol important ca material gluconeogenetic dacă se ţine seama de intensitatea lipolizei în foame. Rolul acidului lactic pentru gluconeogeneză este semnificativ doar în perioadele incipiente ale postului sau ale exerciţiilor fizice cînd muşchii consumă rezerva de glicogen. Hematiile furnizează acid lactic într-un ritm constant şi acesta poate fi reconvertit în glucoză prin gluconeogeneză hepatică.

Utilizarea hepatică a glucozei în faza catabolică este limitată numai la unele reacţii indispensabile, ca sinteza de acid oxaloacetic pentru iniţierea ciclului acizilor tricarboxilici, sinteză de glicerol-fosfat pentru esterificarea surplusului de acizi graşi care pătrund în ficat. Ficatul dispune de o fracţiune importantă de acizi graşi liberi plasmatici, prin transformarea lor în corpi cetonici sau reesterificare în trigliceride pentru a fi din nou eliberate în circulaţie.

Tabelul XI.6

Pierderile de materiale energetice în post

Durata postului	Pierderi în Kcal/zi		
	Glucde	Proteine	Lipide
8—10 ore	200	300	1 200
8 zile	0	200	1 400
40 zile	0	75	1 350

Scanned with OKEN Scanner

Un om sănătos poate supraviețui fără hrană timp de 3—4 luni, făcînd apel la rezervele sale calorice. În tabelul XI.6, se arată ritmul în care sînt utilizate rezervele glucidice, de lipide și de proteine. După 8—10 ore de post, intervalul obișnuit dintre masa de seară și cea de dimineață, organismul a consumat din toate categoriile de componenți, diminuarea depozitului glucidic fiind cea mai importantă. În inaniția prelungită organismul obține glucoza pe seama celorlalți compuși, a proteinelor. Proteinele sînt utilizate continuu dar consumul se reduce de la 300—200 Kcal/zi în primele zile de post la 75 Kcal/zi după 40 de zile de foame. Trigliceridele sînt utilizate într-un ritm constant și la un nivel ridicat.

Scanned with OKEN Scanner

Capitolul XII

METABOLISMUL NUCLEOTIDELOR PURINICE ŞI PIRIMIDINICE

Nucleotidele purinice şi pir midinice sînt componentele structurale ale acizilor nucleici. Pe de altă parte, unele nucleotide libere îndeplinesc şi alte funcţii:

— ATP-ul este transportorul de energie în sistemele biologice;
— AMP-ul ciclic este mediatorul acţiunii hormonilor;
— Unii derivaţi ai nucleotidelor ca UDP-glucoză, UDP-glucuronat, CDP-diglicerid sînt intermediari activi în reacţii biosintetice.

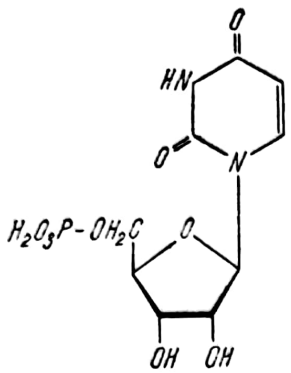
Tabelul XII.1

Denumirile şi prescurtările uzuale ale nucleotidelor purinice şi pirimidinice

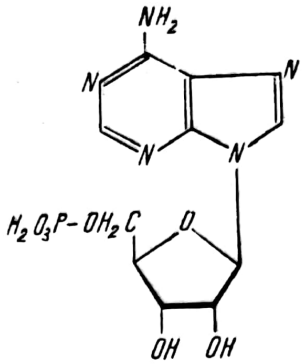
Baza	Ribonucleozid	Ribonucleotid			
		Nucleozid monofosfat		Nucleozid difosfat	Nucleozid trifosfat
Adenină	Adenozină	Ac. adenilic	AMP	ADP	ATP
Guanină	Guanozină	Ac. guanilic	GMP	GDP	GTP
Hipoxantină (6-hidroxipurină)	Inozină		IMP	IDP	ITP
Citozină	Citidină	Ac. citidilic	CMP	CDP	CTP
Uracil	Uridină	Ac. uridilic	UMP	UDP	UTP
Baza	**Dezoxiribonucleozid**	**Dezoxiribonucleotid**			
		Nucleozid monofosfat		Nucleozid difosfat	Nucleozid trifosfat
Adenină	d-Adenozină	Ac. d-adenilic	d-AMP	d-ADP	d-ATP
Guanină	d-Guanozină	Ac. d-guanilic	d-GMP	d-GDP	d-GTP
Timină	Timidină	Ac. timidilic	TMP	TDP	TTP
Citozină	d-Citidină	Ac. d-citidilic	d-CDP	d-CDP	d-CTP

După cum s-a specificat în Cap. V, combinaţia glicozidică a bazei azotate cu riboză (sau dezoxiriboză) este un nucleozid; nucleozidul legat de unul, două sau trei resturi fosforil este un nucleotid (nucleozid — mono-, di- sau trifosfat; a se vedea tabelul XII.1). Formulele unui nucleotid purinic şi pirimidinic sînt următoarele:

Scanned with OKEN Scanner



UMP



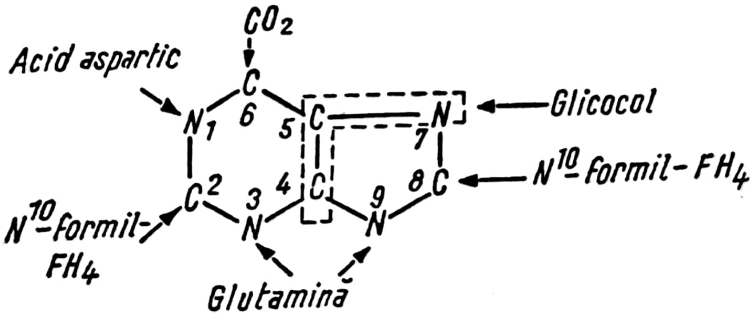
AMP

1. METABOLISMUL NUCLEOTIDELOR PURINICE

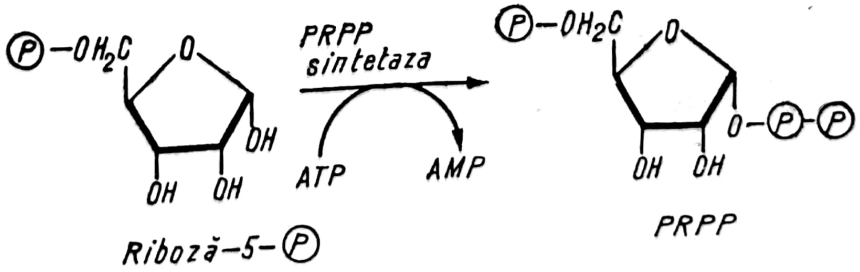
Sinteza eficientă a acizilor nucleici necesită aprovizionarea celulelor cu toate cele patru ribo- şi dezoxiribonucleotide în proporţii bine determinate. Organismele animale au capacitatea de a obţine aceste substanţe prin sinteză *de novo*. Bazele libere ce rezultă prin degradare tisulară a acizilor nucleici sînt parţial reîncorporate în nucleotide.

1.1. SINTEZA DE NOVO A NUCLEOTIDELOR PURINICE

Nucleul purinic este sintetizat din substanţe simple. Originea fiecărui atom a fost stabilită prin utilizarea de precursori etichetaţi cu ^{14}C şi ^{15}N:



Pentoza, sub formă de riboză-5-fosfat, se formează din glucoză pe calea fosfogluconatului (a pentozo-fosfaţilor). La sinteza de nucleoide ia parte o formă activată a ribozei — 5-fosfo-ribozil-1-pirofosfat (PRPP) — care este obţinută prin reacţia:



În sinteza *de novo* nu rezultă baze purinice libere ci numai sub formă de nucleotide. Legătura N-ribozidică (sub formă de 5-fosfo-ribozilamină) se realizează încă din prima etapă, nucleul heterociclic constituindu-se ulterior. În fig. XII.1 se arată secvenţa de reacţii prin care nucleul purinic este construit

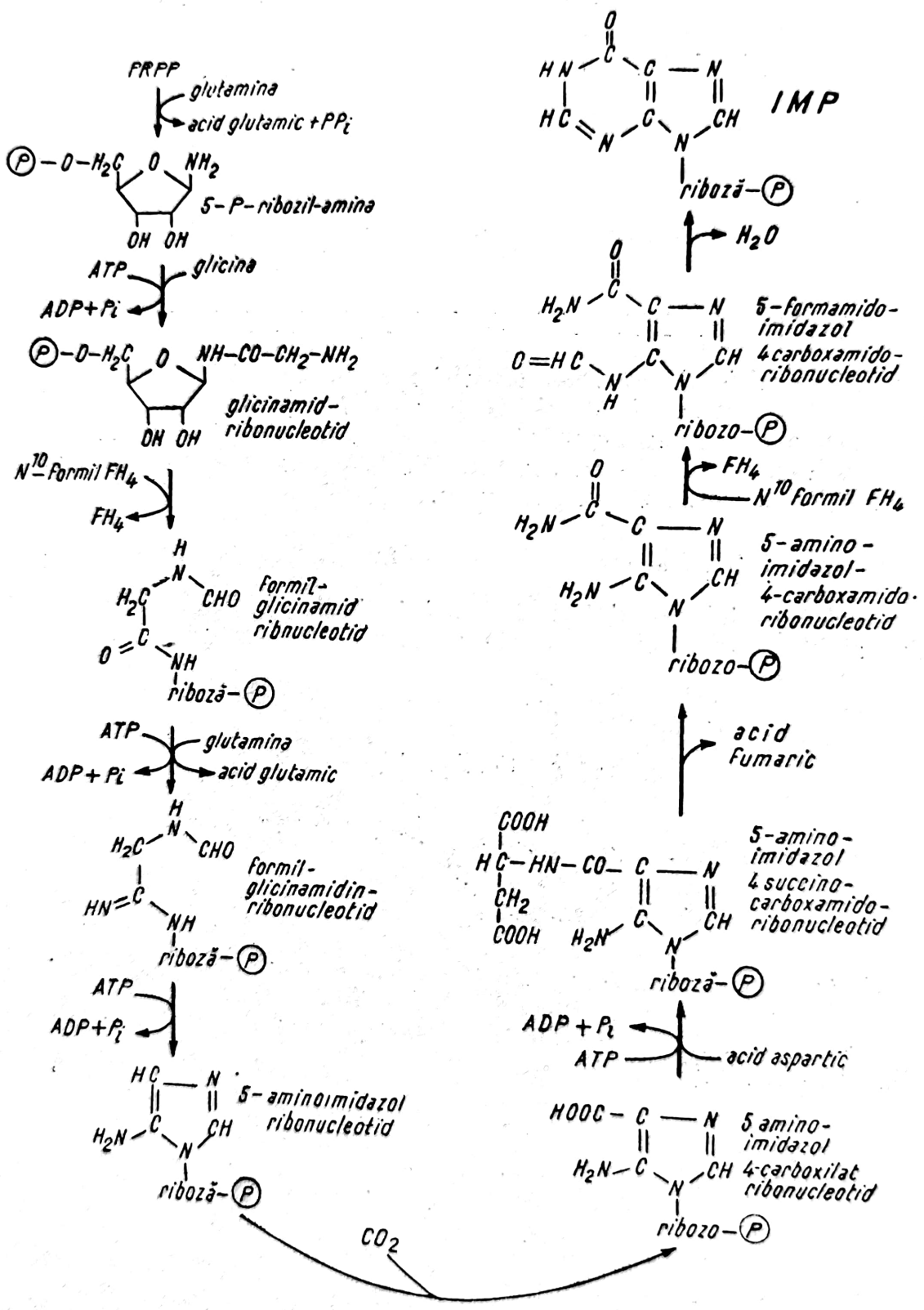
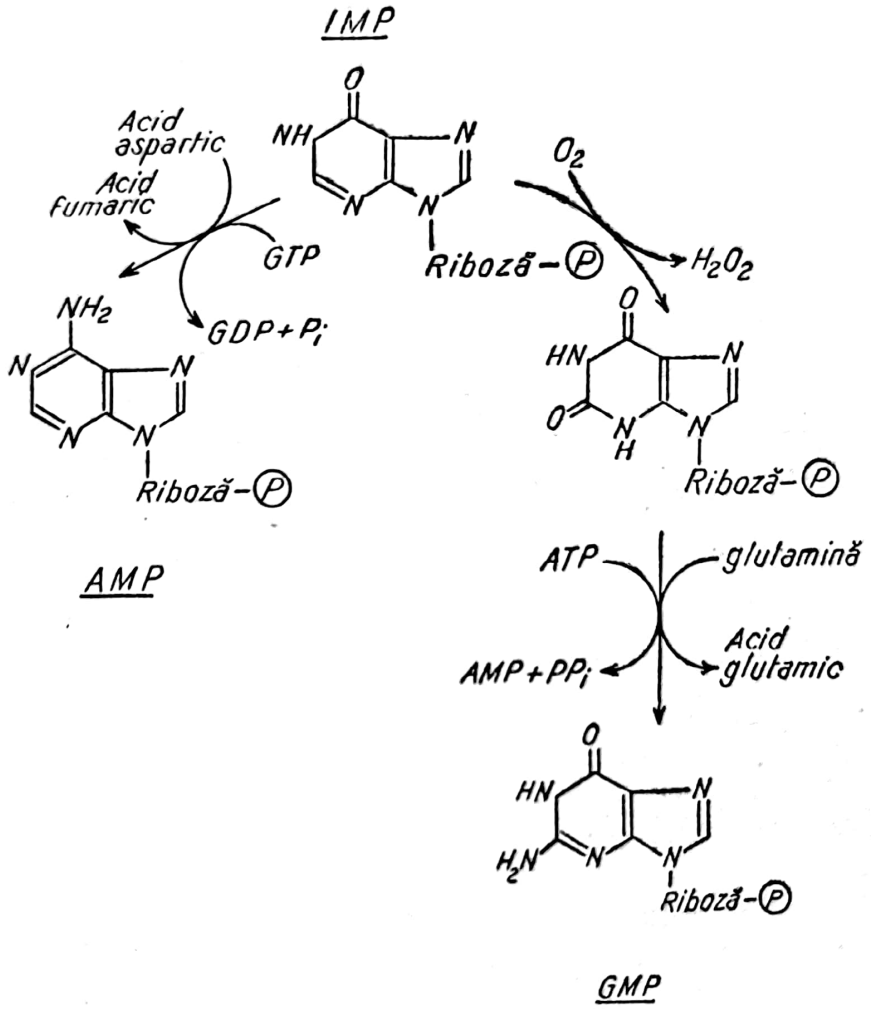


Fig. XII.1. Biosinteza IMP-ului.

pas cu pas începînd de la atomul N_9. Produsul acestei secvenţe este inozin-mono-fosfatul (IMP) care cuprinde drept bază hipoxantina (6-hidroxi-purina). Pornindu-se de la IMP se obţin nucleotidele cu adenină sau cu guanină:



IMP-ul este transformat în AMP prin aminare în poziţia 6 şi acidul aspartic furnizează gruparea aminică. Pentru obţinerea de GMP din IMP se introduce mai întîi o grupare oxigenată în poziţia 2 (se formează baza purinică — xantina) şi apoi are loc aminarea pe seama azotului amidic din glutamină. Conversia IMP-ului în AMP, şi respectiv în GMP sînt cuplate energetic cu scindarea de legături macroergice din GTP şi din ATP. Sinteza nucleotidului cu adenină consumă legături macroergice din GTP iar obţinerea GMP-ului este dependentă energetic de ATP.

1.2. SINTEZA DE NUCLEOZID-DIFOSFAŢI ŞI NUCLEOZID-TRIFOSFAŢI

Prin transfer de grupări fosforil din ATP, nucleozid-monofosfaţii sînt fosforilaţi la nucleozid-difosfaţi şi nucleozid-trifosfaţi:

$$GMP + ATP \rightleftharpoons GDP + ADP$$

$$GDP + ATP \rightleftharpoons GTP + ADP$$

sau

$$AMP + ATP \rightleftharpoons 2\,ADP$$

Fosforilarea ADP-ului constituie reacţia primară de conservare a energiei metabolice şi este cuplată cu reacţii oxidative (fisforilare oxidativă).

1.3. REGLAREA BIOSINTEZEI NUCLEOTIDELOR PURINICE

Sinteza purinelor este riguros controlată pentru a se asigura celulelor cantităţile necesare de nucleotide cît şi o anumită proporţie între adenină şi guanină. Controlul se efectuează prin inhibiţie feed-back la diverse niveluri. Produşii finali — AMP, GMP, IMP — inhibă etapele iniţiale comune de formare a fosfo-ribozil-pirofosfatului şi a fosfo-ribozilaminei (fig. XII.2). În plus,

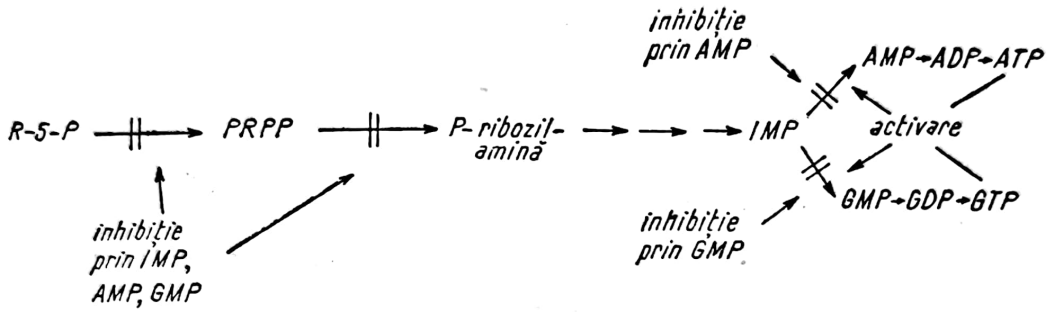


Fig. XII.2. Reglarea biosintezei nucleotidelor purinice.

AMP-ul şi GMP-ul exercită fiecare acţiuni restrictive asupra propriei sale formări din IMP. Dependenţa energetică a transformării IMP→AMP de GTP şi a conversiei IMP→GMP de ATP permite reglarea reciprocă a sintezei adenin- şi guanin-nucleotidelor.

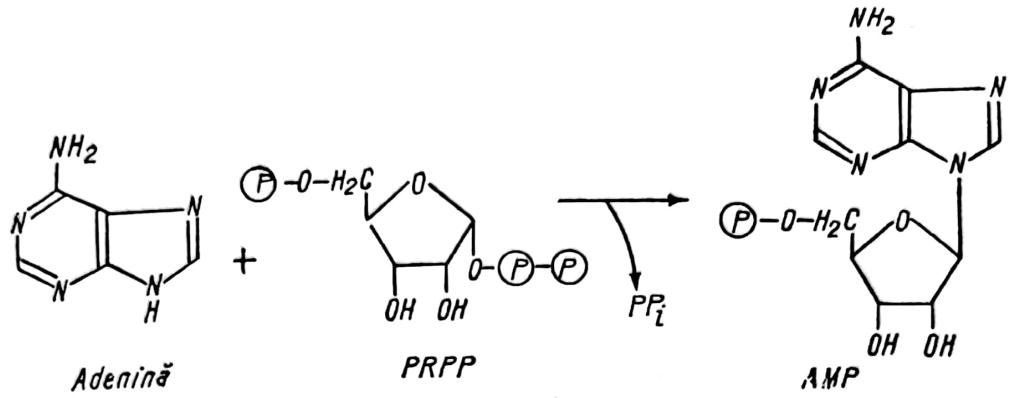
Sinteza *de novo* a nucleotidelor purinice poate fi limitată şi de disponibilităţile organismului de materii prime. Punctul critic îl reprezintă gruparea cu un atom de carbon, formil-FH_4. În carenţele de acid folic încetinirea ritmului de formare a purinelor perturbă sinteza acizilor nucleici şi implicit a proteinelor. Celulele care sintetizează cantităţi mari de proteine sau acelea în diviziune rapidă necesitînd cantităţi mai mari de material informaţional sînt deosebit de sensibile la deficienţa folică (reticulocite, celule tumorale). Acţiunea bacteriostatică a sulfamidelor are la bază aceeaşi cauză, tulburarea sintezei de acizi nucleici ca urmare a incapacităţii celulelor bacteriene de a sintetiza acidul folic. Sulfamidele, analogi chimic ai acidului paraaminobenzoic, împiedică încorporarea acestui compus (factor de creştere pentru bacterii) în molecula de acid folic. Celulele mamiferelor nu sînt sensibile la sulfamide, deoarece ele utilizează acidul folic exogen.

1.4. REUTILIZAREA BAZELOR PURINICE

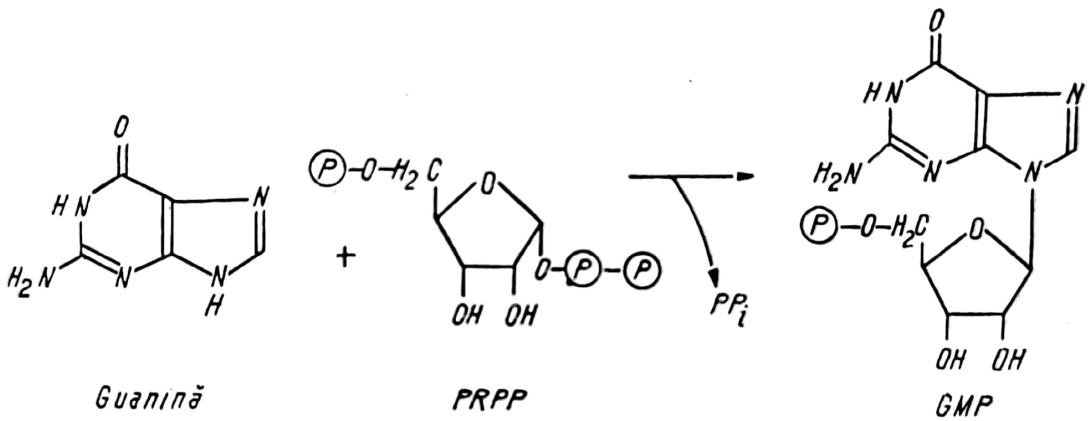
Degradarea tisulară a acizilor nucleici pune în libertate guanina, hipoxantina şi probabil adenina. O fracţiune din aceste baze este transformată în acid uric, catabolit final excretabil, iar o altă fracţiune din bazele purinice este reîncorporată în nucleotide şi în acizi nucleici. Reacţia cheie pentru reutilizarea bazelor libere constă în transferul de ribozil-fosfat din PRPP la

Scanned with OKEN Scanner

purinele libere. Se cunosc două purin-fosforibozil transferaze, una cu specificitate pentru adenină:



și alta pentru guanină (și hipoxantină):

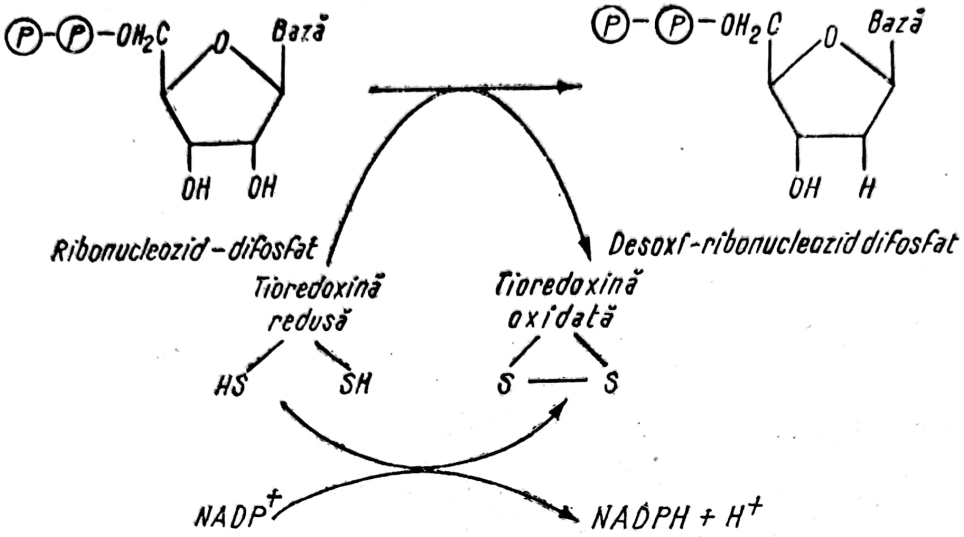


Această ultimă cale, mult mai puțin costisitoare în ceea ce privește materiile prime și consumul de energie, prezintă o importanță deosebită în special pentru țesuturile extrahepatice unde sinteza *de novo* este puțin eficientă. Absența totală, sau aproape totală, la unii subiecți a guanin-fosforibozil transferazei, determină o maladie metabolică cu tulburări neurologice foarte grave, deficiență mintală, agresivitate, hiperuricemie (sindromul Lesch-Nyhan). Maladia este caracterizată biochimic prin creșterea fluxului de metaboliți pe calea sintezei *de novo* a purinelor (datorită acumultării de PRPP) și prin creșterea fondului de acid uric. Expresia clinică gravă a incapacității de reutilizare a purinelor libere demonstrează importanța pentru organism a acestei căi cu toate că relația dintre defectul enzimatic și manifestările neurologice este necunoscută.

1.5. SINTEZA DEZOXIRIBONUCLEOTIDELOR

Nucleotidele cu dezoxiriboză sînt obținute din ribonucleotide prin transformarea restului ribozil în dezoxiribozil, reacție ce implică reducerea grupării alcoolice din poziția C_2. Echivalenții reducători sînt furnizați în final de NADPH. La reacție mai participă un sistem redox intermediar consti-

tuit dintr-o proteină mică — tioredoxina — care avînd două resturi cisteinil vecine poate să oscileze între o formă oxidată (disulfură) şi una redusă (tioalcoolică). Transferul de hidrogen este mediat enzimatic:



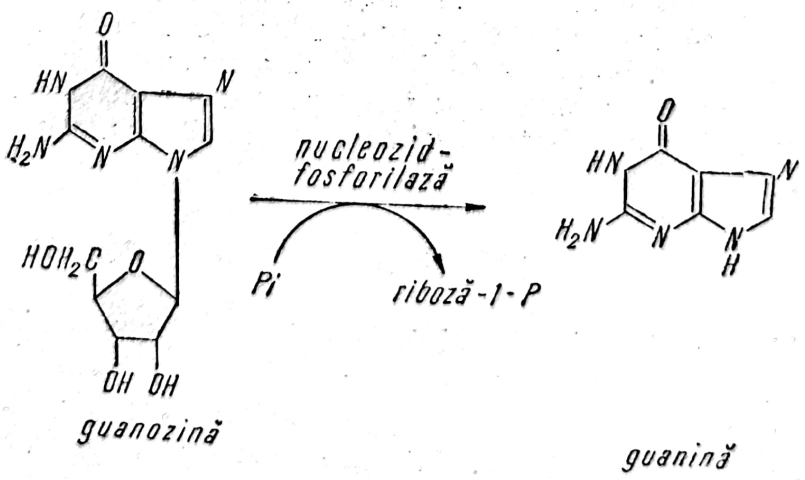
1.6. CATABOLISMUL NUCLEOTIDELOR PURINICE

Acizii nucleici au o activitate metabolică ridicată, ei sînt continuu degradaţi şi reînnoiţi. Duplicarea ADN-ului asigură conservarea materialului informaţional genetic şi transmiterea sa de la o generaţie de celule la altă generaţie. Sinteza de ARN, în special de ARN-mesager, este corelată cu ritmul sintezei proteice căreia îi furnizează tiparul pentru înlănţuirea aminoacizilor în lanţurile polipeptidice.

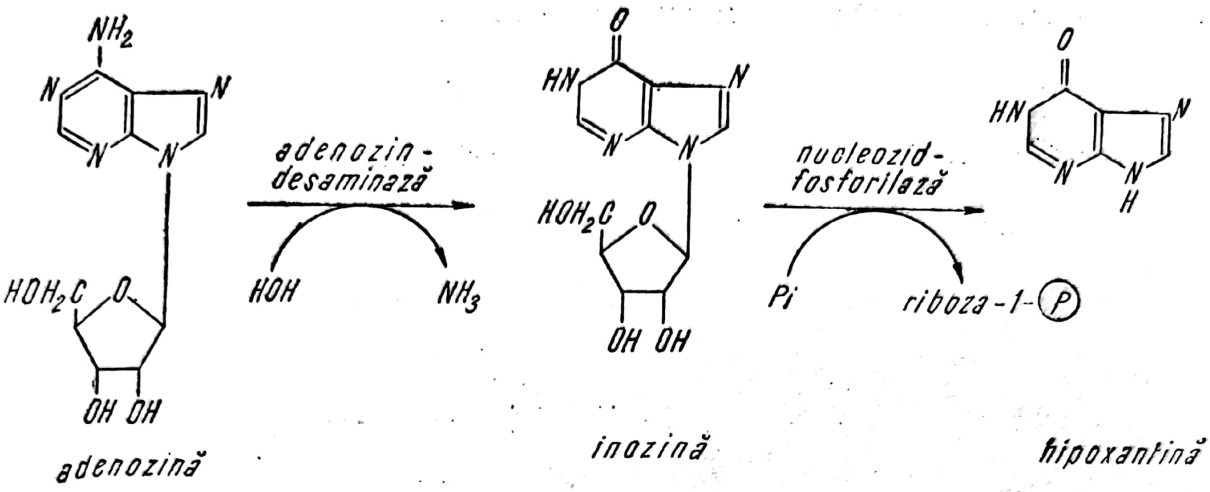
Acizii nucleici sînt scindaţi în nucleotide sub acţiunea unor fosfodiesteraze specifice — ribonucleaze şi dezoxiribonucleaze. Asupra nucleotidelor acţionează nucleotidaze (fosfomonosteraze) care îndepărtează restul fosforil determinînd formarea nucleozidelor. Din nucleozide baza azotată este pusă în libertate fosforolitic, prin transferul restului ribozil pe acidul fosforic:

$$\text{nucleozid} + H_3PO_4 \xrightarrow[\text{fosforilază}]{\text{nucleozid-}} \text{bază} + \text{riboză-1-}\textcircled{P}$$

Pentru guanozină reacţia este următoarea:



În cazul adenozinei, fosforoliza este precedată de dezaminarea bazei, formîndu-se intermediar nucleozidul hipoxantinei (inozina):



adenozină inozină hipoxantină

Bazele care nu sînt reîncorporate în nucleotide sînt degradate la acid uric (fig. XII.3). Acidul uric este termenul final al catabolismului purinelor numai pentru om şi maimuţele antropoide. La celelalte specii nucleul purinic este degradat la compuşi din ce în ce mai simpli, pînă la bioxid de carbon şi amoniac.

Acidul uric este un acid de o tărie apreciabilă ($pK_1 = 5,7$ şi $pK_2 = 10,3$) şi la pH-ul fiziologic el se află ca monourat de sodiu. Acidul liber este puţin solubil în apă. Monouratul are o solubilitate ceva mai mare (7 mg/100 ml în ser, la 37°). Concentraţia plasmatică a acidului uric este de aproximativ 6 mg/100 ml, fiind cu puţin mai mică la femei. La nivelul tubilor renali acidul uric este reabsorbit din filtratul glomerular fiind apoi eliminat prin secreţie tubulară.

1.7. GUTA

Guta este o maladie destul de răspîndită, caracterizată prin hiperuricemie (>7 mg/100 ml). Creşterea fondului de acid uric duce la depunerea acestui compus în articulaţiile extremităţilor (artrită gutoasă), în rinichi (nefrolitiază uratică) şi în alte ţesuturi sub formă de tofi. Hiperuricemia poate fi rezultatul unor tulburări genetice ale metabolismului nucleotidelor purinice (guta primară, metabolică) sau este efectul secundar al unor maladii (gută secundară). În guta metabolică fondul de acid uric creşte progresiv prin accelerarea sintezei *de novo* a nucleotidelor purinice ca urmare a dereglării mecanismelor feedback de control sau prin funcţionarea defectuoasă a căii de reîncorporare a bazelor în nucleotide (salvage pathway). În aceste condiţii cantităţi crescute de baze intră în secvenţa terminală catabolică care duce la acid uric. Au fost descrise şi cazuri de gută cu o producţie normală de acid uric, dar pacienţii respectivi prezentau defecte înnăscute în mecanismul de secreţie tubulară a acidului uric (guta primară renală).

Guta secundară se manifestă în diverse boli asociate cu un *turnover* crescut al acizilor nucleici ca: iradiere cu raze X, boli hematopoietice, leucemii, infecţii cronice. Disfuncţiile renale sînt asociate cu hiperuricemii de diverse grade, ca urmare a perturbării secreţiei de acid uric.

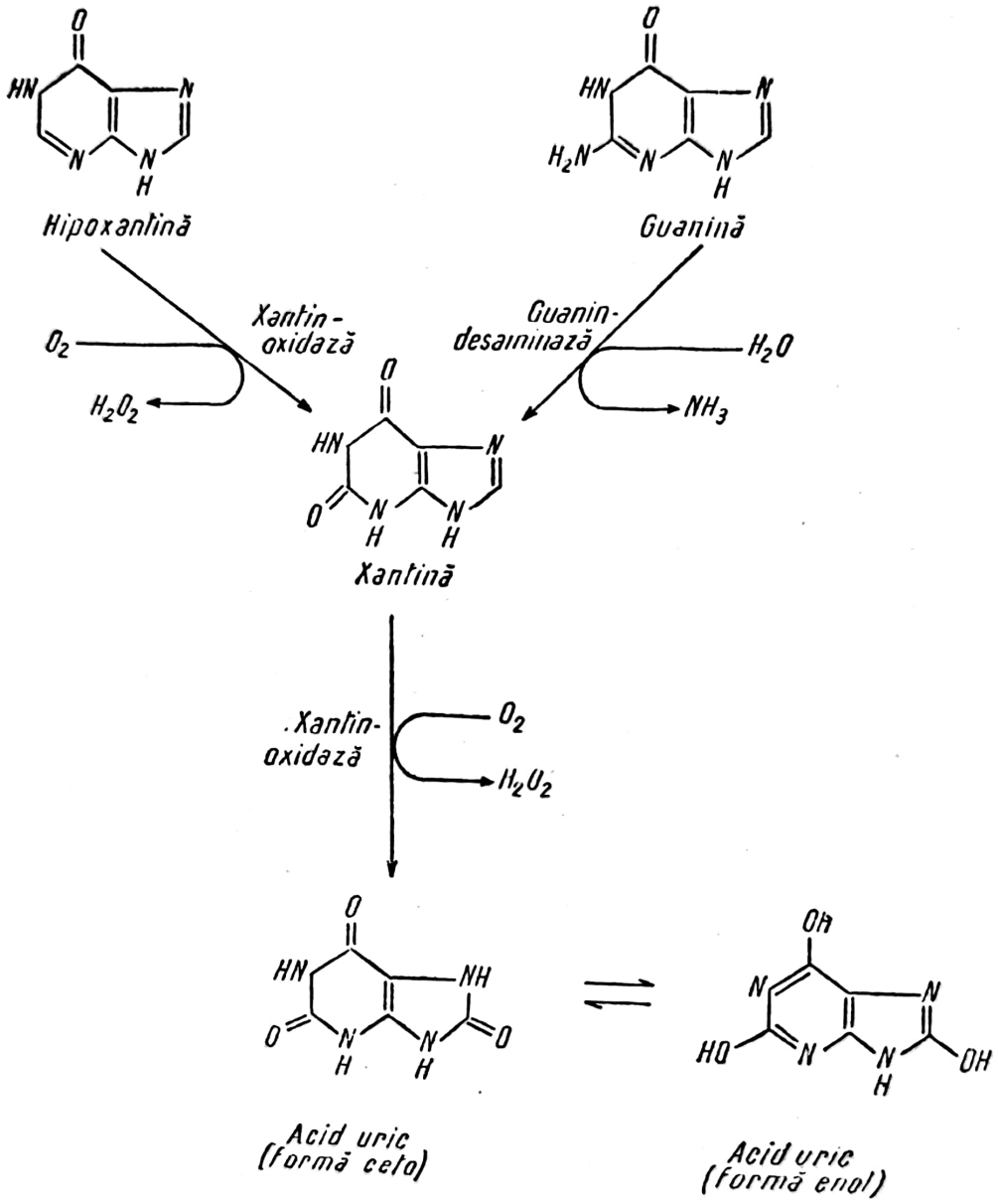
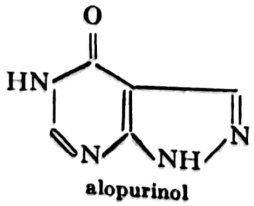
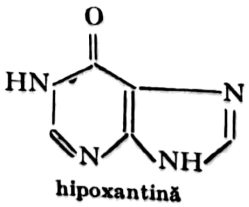


Fig. XII.3. Formarea acidului uric.

Hiperuricemiile, fie primare, fie secundare, sînt corectate prin administrare de alopurinol. Acest compus este un analog structural al hipoxantinei:


alopurinol

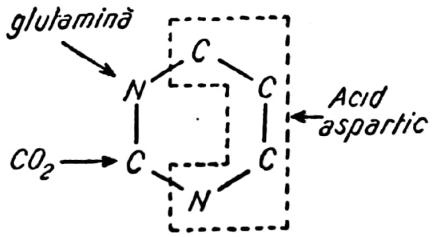

hipoxantină

El inhibă xantin-oxidaza şi împiedică transformarea hipoxantinei în xantină şi a acesteia din urmă în acid uric. În aceste condiţii, hipoxantina şi xantina sînt excretate drept cataboliţi ai purinelor (hipoxantina provine din adenină iar xantina din guanină). Hipoxantina şi xantina sînt mult mai uşor solubile decît acidul uric, nu se mai depun în ţesuturi, evitîndu-se efectele dăunătoare ale hiperuricemiilor.

2. METABOLISMUL NUCLEOTIDELOR PIRIMIDINICE

2.1. SINTEZA NUCLEOTIDELOR PIRIMIDINICE

Nucleul pirimidinic este sintetizat *de novo* pornindu-se de la CO_2, glutamină şi acid aspartic:



Spre deosebire de sinteza nucleotidelor purinice unde nu se obţine o purină liberă, sinteza pirimidinelor duce la formarea unei pirimidine (acid orotic) care prin acceptarea unui rest fosfo-ribozil din PRPP dă naştere unui nucleotid.

Prima reacţie a secvenţei este obţinerea de carbamil-fosfat prin reacţia:

$$\text{glutamină} + 2\text{ATP} + HCO_3^- \rightarrow H_2N-CO-O-\textcircled{P} + 2\text{ADP} + P_i + \text{acid glutamic}$$

catalizată de carbamil-fosfat sintetază II. (Sintetaza I participă la formarea carbamil-fosfatului utilizat la sinteza ureei.) Cele două enzime diferă prin localizare intracelulară, carbamil-fosfatul ureogenetic se formează în mitocondrii iar cel pirimidinogenetic în citosol; de asemenea furnizorul de azot este amoniacul într-un caz şi glutamina în celălalt.

Restul carbamil este transferat la gruparea aminică a acidului aspartic formîndu-se acidul carbamil aspartic (fig. XII.4). Mai departe, prin eliminare de apă şi dehidrogenare, se obţine un compus pirimidinic — acidul orotic. Prin transferul restului fosforibozil din PRPP se formează nucleotidul — acid orotidilic — care după decarboxilare dă naştere uridinmonofosfatului (UMP).

De la UMP se obţin toate celelalte nucleotide pirimidinice. Prin fosforilări UMP dă naştere la UDP şi UTP:

$$\text{UMP} + \text{ATP} \rightleftharpoons \text{UDP} + \text{ADP}$$

$$\text{UDP} + \text{ATP} \rightleftharpoons \text{UTP} + \text{ADP}$$

Scanned with OKEN Scanner

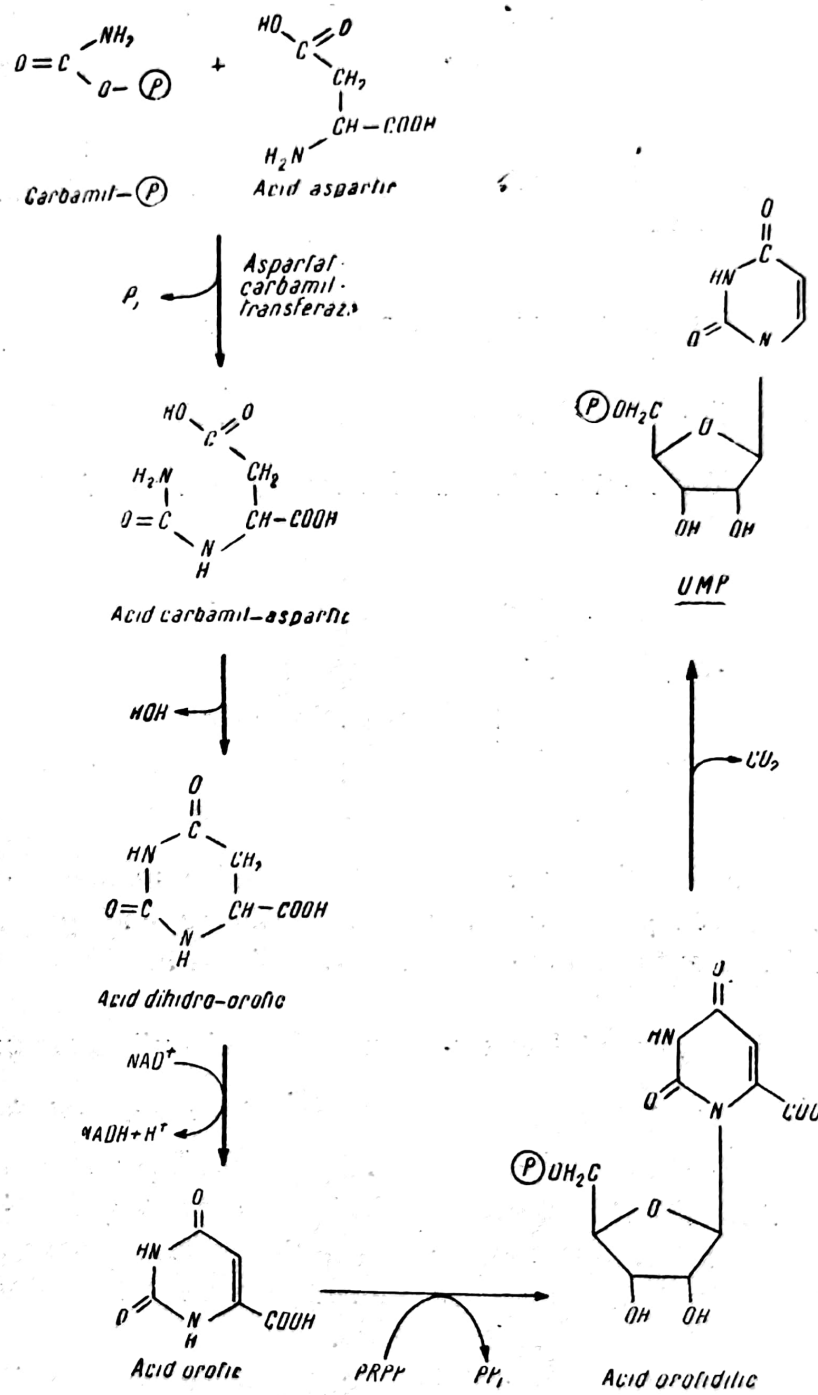
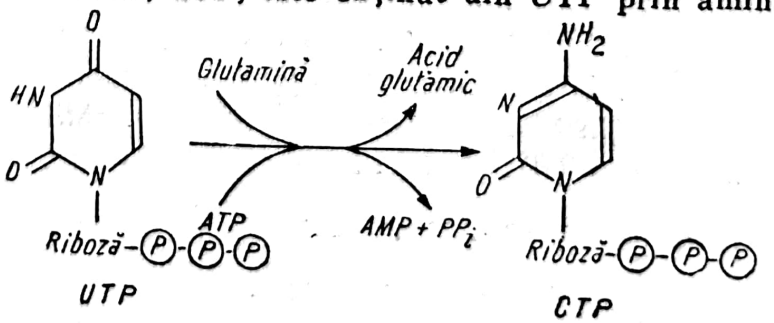


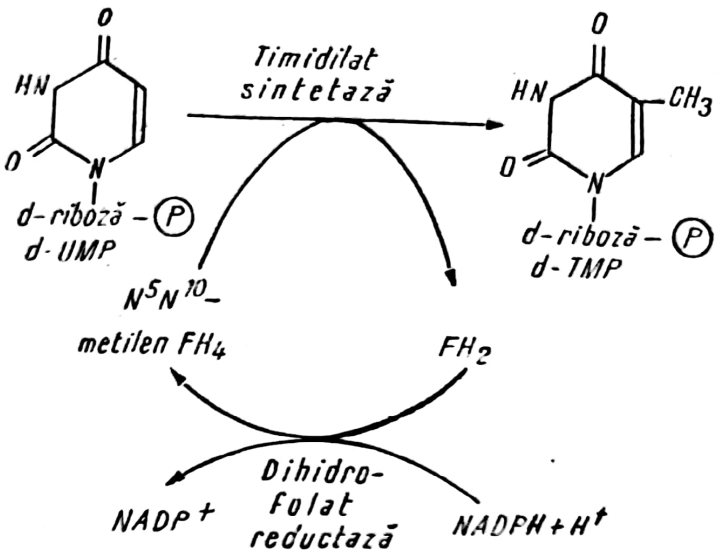
Fig. XII.4. Biosinteza UMP-ului.

Nucleotidul cu citozină, CTP, este obţinut din UTP prin aminare:

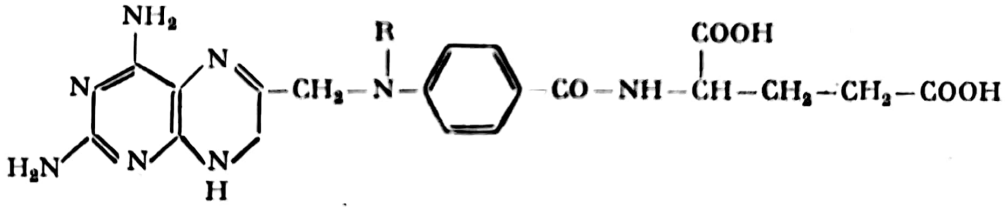


Dezoxiribonucleotidele pirimidinice sînt obţinute ca şi cele purinice prin reducerea restului ribozil din ribonucleozid-difosfaţi.

Nucleotidul cu timină — dTMP — rezultă prin metilarea d-UMP-ului:



N^5, n^{10}-metilen-FH_4 furnizează gruparea $-CH_3$ concomitent transformîndu-se în acid dihidrofolic (FH_2). Pentru a reintra în circuitul metabolic acidul dihidrofolic este redus de o reductază. Această etapă poate fi blocată cu ajutorul unor analogi ai acidului dihidrofolic, ca aminopterină şi ametopterină, care inhibă dihidrofolat reductaza.



R=H aminopterină

R=CH_3 ametopterină

Aceste substanţe sînt utilizate în chemoterapia cancerului, întrucît celulele tumorale necesită cantităţi sporite de timină pentru încorporare în ADN.

Controlul sintezei nucleotidelor pirimidinice are loc prin inhibiţie feedback. Punctele de control sînt situate la nivelul carbamil-fosfat sintetazei şi al aspartat-carbamil transferazei:

CO_2 + glutamină → carbamil-fosfat → carbamil-aspartat → UMP → UDP → CTP

inhibiţie prin UMP — inhibiţie prin CTP

Aspartat-carbamil transferaza este activată de ATP, competitiv faţă de CTP, fapt ce permite o coordonare a vitezelor de formare a nucleotidelor purinice şi pirimidinice pentru ca celulele să dispună de cantităţi comparabile din cele două categorii de nucleotide.

2.2. CATABOLISMUL NUCLEOTIDELOR PIRIMIDINICE

Nucleul pirimidinic, spre deosebire de cel purinic care este eliminat intact din organism, este degradat pînă la substanţe simple, CO_2, amoniac şi

β-alanină (din citozină și uracil) sau acid β-aminoizobutiric (din timină). Acești ultimi compuși sînt ei singuri degradați la CO_2 și H_2O pe căile oxidative terminale (fig. XI.5).

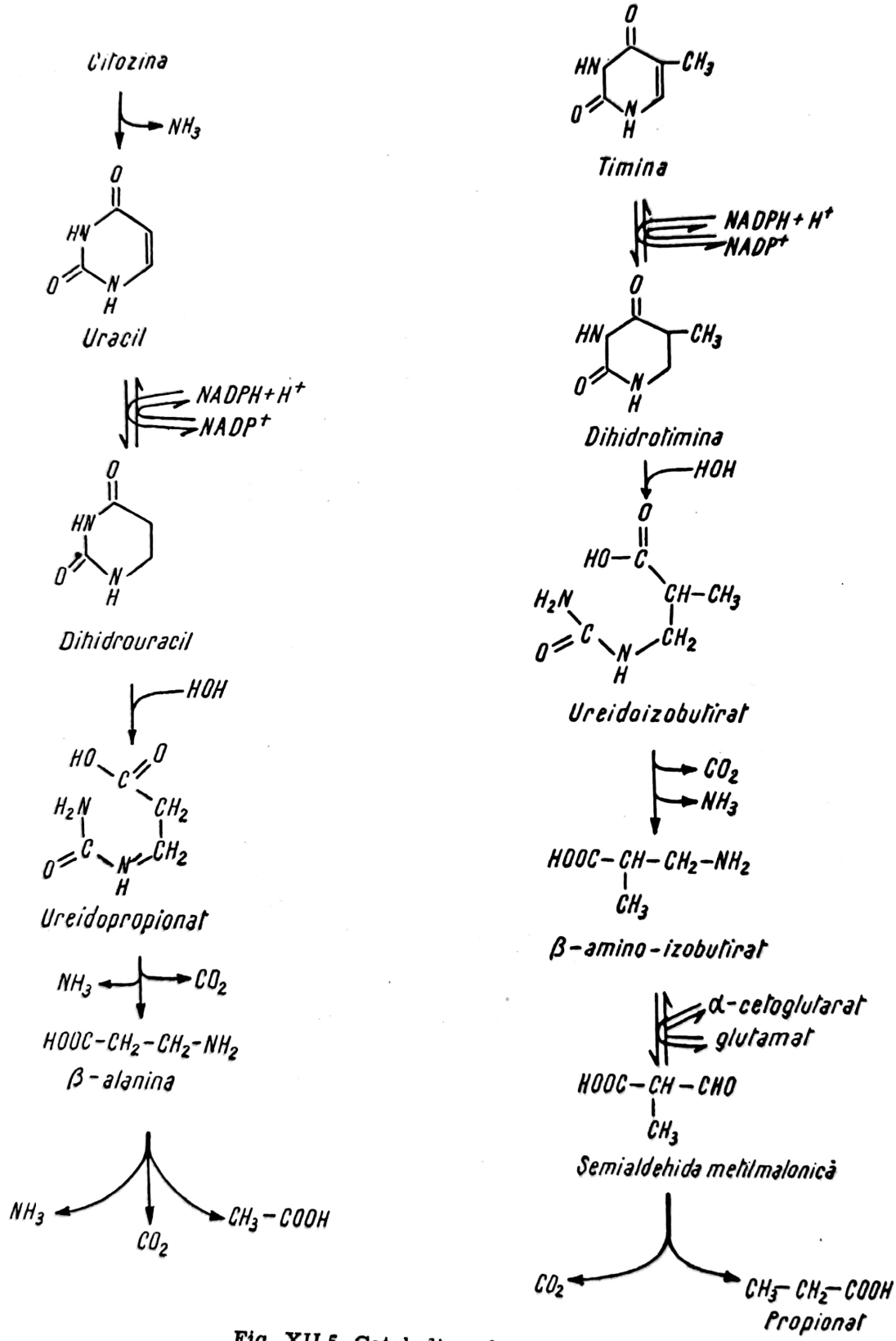


Fig. XII.5. Catabolismul pirimidinelor.

Capitolul XIII

HORMONII

1. INTRODUCERE

O celulă își reglează intensitatea diverselor activități prin modificarea vitezei reacțiilor enzimatice. La organismele unicelulare unde funcționează doar un mecanism primitiv de reglare, celula recepționează direct modificările survenite în mediul înconjurător. La organismele pluricelulare pe lîngă acest mecanism, amplificat și complexificat în cursul evoluției, mai funcționează sistemul nervos și sistemul hormonal ca mijloace de cooperare și comunicație intercelulară, de integrare a activității fiecărei celule în beneficiul întregului organism.

Hormonii sînt substanțe chimice elaborate de celule specializate care pe cale sanguină ajung la organele sensibile la acțiunea lor unde exercită acțiuni reglatoare asupra proceselor metabolice.

Celulele specializate în elaborarea unui hormon sînt, în general, grupate în unități anatomice distincte, glandele endocrine. Alteori celulele secretoare sînt răspîndite printre celule cu alte funcțiuni.

Țesuturile care răspund în mod specific la acțiunea unor hormoni sînt țesuturi țintă pentru unul sau mai mulți hormoni, Interacțiunea dintre hormon și țesutul țintă se realizează prin intermediul unor componente ale membranei plasmatice care au rolul de a recunoaște hormonul și de a transmite mesajul hormonal altor sisteme celulare care amplifică semnalul inițial pînă cînd se înregistrează un răspuns metabolic. Receptorii membranari, deși nu au fost izolați, sînt foarte probabil proteine ce răspund la impactul hormonal prin tranziții conformaționale care sînt preluate și transmise unor sisteme intermediare intracelulare. Un același țesut poate cuprinde receptori pentru mai mulți hormoni, după cum un același hormon poate declanșa răspunsuri diverse în țesuturi diferite. Calitatea și intensitatea răspunsului celular la un anumit mesaj hormonal depinde nu numai de natura hormonului, dar și de natura receptorilor și a sistemului transducțional celular.

Natura chimică a hormonilor este destul de variată. Hormonii sexuali și cei elaborați de cortexul suprarenalei sînt substanțe steroidice. Hormonii pancreatici, hipofizari, paratiroidieni sînt de natură peptidică, numărul resturilor aminoacide variind de la cîteva (hormonii neurohipofizari sînt nonapeptide) la cîteva zeci sau sute de resturi (insulina cuprinde 51 resturi de aminoacizi, hormonul de creștere 191). Hormonii tiroidieni și cei secretați de medulosuprarenală sînt derivați ai unor aminoacizi.

Scanned with OKEN Scanner

Hormonii sînt secretaţi în cantităţi foarte mici, concentraţiile lor plasmatice sînt mult mai joase (de mii şi de zeci de mii de ori) decît ale altor componenţi sanguini. Funcţia reglatoare a hormonilor este posibilă numai dacă moleculele sînt inactivate şi eliminate din organism imediat ce au redresat parametrul biologic dereglat. Timpurile de înjumătăţire ale hormonilor circulanţi sînt scurte, de cîteva minute pînă la cîteva ore.

Secreţia unui hormon suferă fluctuaţii de intensitate puternice în raport cu diverşi factori. Liberarea hormonilor de către celulele secretoare este controlată foarte fin prin funcţionarea unor mecanisme de retrocontrol. Majoritatea glandelor endocrine (fac excepţie paratiroida, pancreasul) sînt controlate prin intermediul hipofizei anterioare care elaborează hormoni, tropine, cu funcţie de reglare a activităţii glandelor endocrine. Nivelurile plasmatice ale hormonilor periferici şi ale celor adenohipofizari variază în mod invers, unei concentraţii scăzute de hormon periferic îi corespunde o concentraţie ridicată de tropină hipofizară care controlează activitatea glandei. Relaţiile feed-back între adenohipofiză şi glandele endocrine aflate sub controlul acesteia se stabilesc atît direct, cît şi prin intermediul regiunilor hipotalamice ale sistemului nervos central. Hipotalamusul elaborează substanţe specifice al căror rol este declanşarea secreţiei hormonilor adenohipofizari (factori sau hormoni de eliberare) sau inhibiţia eliberării acestora (factori sau hormoni de inhibiţie a eliberării de tropine). Secreţia factorilor de eliberare sau de inhibiţie a eliberării este controlată de feed-back negativ la care participă atît hormonul glandei periferice, cît şi tropina hipofizară. Hipotalamusul primeşte totodată stimuli pentru secreţia factorilor de eliberare din regiunile învecinate ale sistemului nervos central realizîndu-se o interconectare neuro-endocrină.

Glandele paratiroide şi pancreasul endocrin par a nu fi sub controlul hipotalamo-hipofizar. Activitatea secretoare a acestor glande este reglată de parametrul biologic pe care ele însele îl controlează, glicemia şi respectiv calcemia. Creşterea glicemiei declanşează eliberarea de insulină cu acţiune hipoglicemiantă. Parathormonul este eliberat ca răspuns la hipocalcemie, ca prin acţiunea sa hipercalcemiantă calcemia să fie redresată.

Mecanismul general de acţiune a hormonilor. Funcţiile reglatoare ale hormonilor se exercită prin modificarea vitezei unor procese metabolice din ţesuturile ţintă. Ei modulează viteza reacţiilor cheie, limitante pentru procesul dat (reacţii „pace maker"). Reglarea hormonală se realizează pe cele două căi de reglare metabolică, prin modificări ale activităţii catalitice a enzimelor celulare preexistente sau prin variaţii ale cantităţilor de proteine enzimatice. De asemenea alterarea permeabilităţii membranelor celulare pentru ioni metalici (K^+, Ca^{2+}) sau pentru unii metaboliţi poate fi mecanismul primar de acţiune a hormonilor.

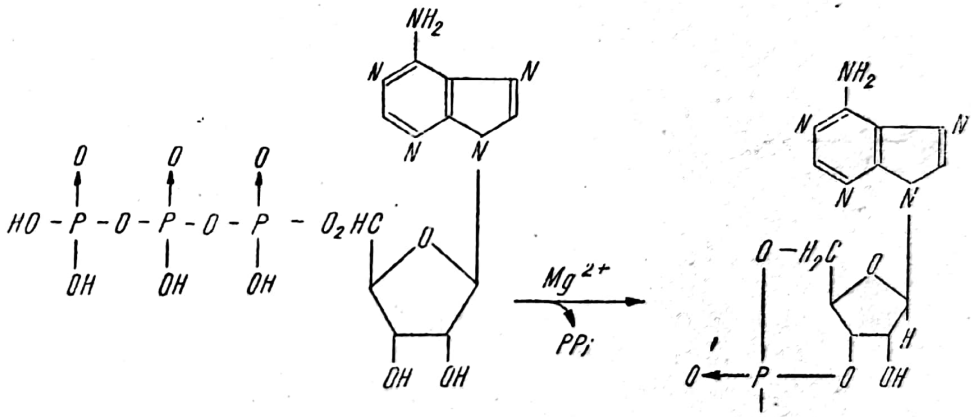
Pentru hormonii steroidici — estrogeni, androgeni, progestine şi corticosteroizi — s-a demonstrat accelerarea sintezei de proteine specifice în ţesuturile ţintă. De exemplu, proliferarea uterului sub acţiunea esterogenilor, inducţia sintezei de transaminaze hepatice sub acţiunea cortisolului etc. Steroizii afectează sinteza de proteine intervenind fie în etapa transcrierii, fie în cea de traducere a informaţiei genetice înscrisă în ADN-ul nuclear. Moleculele steroizilor de dimensiuni mici şi cu polarităţi reduse străbat sau sînt translocate prin membranele celulare şi în citosol hormonii steroidici interacţionează cu proteine specifice (receptori celulari). Complexul receptor-steroid pătrunde în nucleu şi este fixat pe anumite structuri nucleare, nucleol, cromatină şi de la

Scanned with OKEN Scanner

acest nivel steroidul (sau receptorul) controlează sinteza de ARN mesager prin demascarea unor porțiuni din lanțurile polinucleotidice de ADN. În afară de creșterea concentrației de ARN nesager s-a mai constatat că steroizii afectează sinteza proteică și prin prelungirea vieții biologice a ARN-ului mesager, prin creșterea eficienței de utilizare a ARN-ului mesager ca tipar pentru înlănțuirea aminoacizilor.

Hormonii nesteroidici acționează în general prin modificări de activitate catalitică a unor enzime preexistente. Acești hormoni nu traversează membranele celulelor țintă. Semnalul hormonal este înregistrat de receptori membranari care îl transmit mai departe unui sistem intermediar de prelucrare transformîndu-l într-un al doilea mesager. Sistemul auxiliar de transfer transmembranar al mesajului hormonal extracelular este alcătuit din nucleotidul ciclic 3′,5′-adenozin-monofosfat (AMP-ciclic, c-AMP) și din enzima care îl sintetizează, adenil-ciclaza.

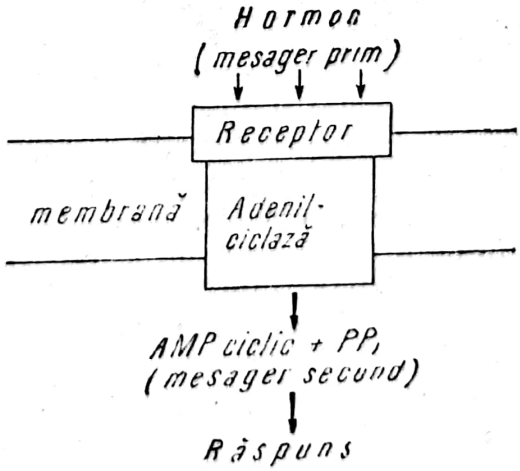
AMP-ciclic este un compus ubicuitar. Concentrația sa este însă mult mai mică decît a celorlalte nucleotide cu adenină (AMP, ADP, ATP) și suferă fluctuații ample sub acțiunea diverșilor hormoni. Sinteza de AMP ciclic este catalizată de o enzimă specifică, adenil-ciclaza:



ATP AMPc

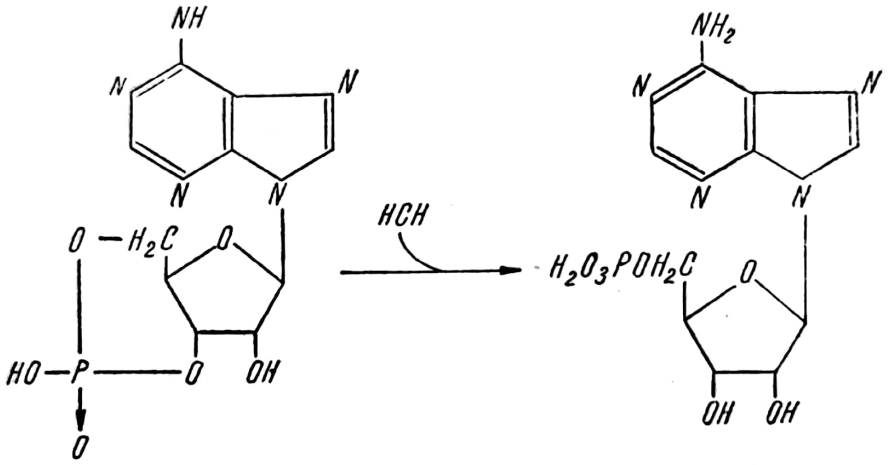
Adenil-ciclaza este localizată în membranele celulare, cu centrul catalitic orientat spre fața internă, astfel încît produșii de reacție, AMP-ciclic și pirofosfatul, sînt eliberați în interiorul celulei.

AMP-ul ciclic — mesagerul hormonal secund — transformă semnalul primar extracelular într-un răspuns intracelular:



Glicogenoliza este unul dintre procesele metabolice reglate hormonal via AMP-ciclic. Hormonii glicogenolitici, adrenalina şi glucagonul, determină creşterea concentraţiei de AMP-ciclic în ţesuturile ţintă (ficat, muşchi) care mai departe activează alosteric un sistem de kinaze care fosforilează glicogen-fosforilaza, comutînd-o în forma catalitic-activă (a se vedea Cap. Metabolismul glucidelor). Modularea activităţii enzimelor prin fosforilări dependente de AMP-ciclic constituie mecanismul general de acţiune al acestui nucleotid. Proteinele prin fosforilare suferă tranziţii conformaţionale care le alterează funcţiile specifice.

AMP-ciclic este inactivat intracelular prin hidroliza legăturii fosfodiesterice, transformîndu-se în 5′-AMP:



Reacţia este catalizată de o fosfodiesterază. Activitatea acestei enzime are un rol important în controlul concentraţiei intracelulare de AMP-ciclic. Sînt dovezi că unii hormoni acţionează prin activarea sau inactivarea fosfodiesterazei, scurtînd sau prelungind perioada de acţiune a AMP-ciclic.

Paralel cu fluctuaţiile concentraţiei AMP-ciclic sub impactul hormonal au loc şi variaţii ale concentraţiei ionilor Ca^{2+} în citosol. Reacţia adenil-ciclazei determină o acumulare de pirofosfat şi datorită afinităţii sale pentru ionii Ca^{2+} are loc un influx de ioni Ca^{2+} din spaţiul extracelular. Ionii Ca^{2+} singuri, sau împreună cu AMP-ciclic modulează procesele biochimice care se manifestă ca rezultat al semnalului hormonal. Creşterea concentraţiei Ca^{2+} citosolic inhibă adenil-ciclaza şi activează fosfodiesteraza. Prin reducerea activităţii adenil-ciclazei scade concentraţia pirofosfatului şi influxul de ioni Ca^{2+} se opreşte. Răspunsul celular la mesajul hormonal este blocat prin scăderea concentraţiilor celor doi efectori, AMP-ciclic şi Ca^{2+}.

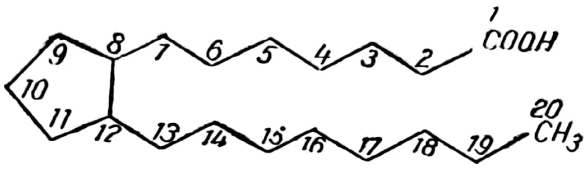
Acţiunea hormonilor prin intermediul AMP-ciclic ca mesager secund apare ca fiind nespecifică. Diverşi hormoni produc un acelaşi efect intracelular, creşterea concentraţiei nucleotidului ciclic. Se crede că varietatea efectelor intracelulare determinate de diverşii hormoni s-ar datora multiplicităţii moleculare a adenil-ciclazelor şi interacţiunii lor specifice numai cu un anume hormon. Pe de altă parte, profilul enzimatic specific al fiecărui tip de celulă face ca acelaşi efector celular, AMP-ciclic, să producă efecte atît de variate.

Un alt sistem de transmitere a unor mesaje extracelulare în interiorul celulelor este constituit de guanil-ciclază şi de GMP-ciclic. Acest nucleotid are

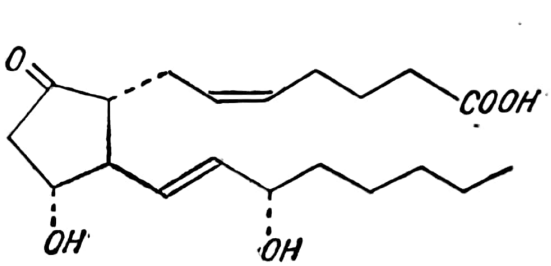
acţiuni antagonice cu ale AMP-ciclic, concentraţiile lor variază în mod invers. Se pare că GMP ciclic este implicat în special în controlul diviziunii şi diferenţierii celulare, pe cînd AMP ciclic reglează unele funcţii celulare specifice.

Prostaglandinele alcătuiesc un grup de substanţe răspîndite ubicuitar şi care exercită o multitudine de efecte fiziologice locale. După unii autori sînt considerate ca modulatori ai acţiunii hormonilor, potenţîndu-le sau moderîndu-le acţiunile, după alţii prostaglandinele sînt hormoni tisulari, locali.

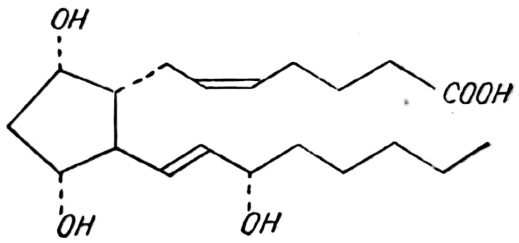
Se cunosc multe substanţe active care derivă dintr-un acid gras ipotetic cu 20 C, acidul prostanoic:



În toate tipurile de prostaglandine există o legătură dublă cu configuraţie trans la C_{13} şi o grupare hidroxil (α) la C_{15}. Diversele grupe de prostaglandine se diferenţiază prin prezenţa unor grupări oxigenate în ciclul pentanic şi prin numărul dublelor legături. Două dintre cele mai răspîndite prostaglandine primare sînt prostaglandina E_2 (PGE_2) şi $F_{2\alpha}$ ($PGF_{2\alpha}$) cu formulele:



PGE_2



$PGF_{2\alpha}$

Prostaglandinele au efecte fiziologice foarte puternice şi de o varietate extraordinară depinzînd atît de tipul substanţei (E, F) cît şi de natura ţesutului, de doza administrată. Prostagandinele determină creşterea amplitudinii şi frecvenţei contracţiilor uterului, a mobilităţii gastrice şi intestinale, au acţiune bronhodilatatoare, scad tensiunea arterială etc.

În ceea ce priveşte efectele primare, celulare ale prostaglandinelor nu se cunoaşte încă exact mecanismul lor de acţiune. În unele experienţe s-a constatat că prostaglandinele au ca efect intracelular scăderea concentraţiei AMP-ciclic, fie prin activarea fosfodiesterazei, fie prin inhibiţia adenil-ciclazelor. Prin aceasta prostaglandinele antagonizează efectele hormonilor a căror acţiune este mediată de AMP-ciclic. Totuşi, datele obţinute pînă acum nu sînt suficient de concludente pentru a oferi o explicaţie unitară a mecanismului de acţiune a prostaglandinelor.

Prostaglandinele sînt sintetizate din acid arahidonic, acid gras polietilenic (acid $\Delta^{5,8,11,14}$-eicosatetraenoic), prezent în compoziţia fosfolipidelor tisulare. Acidul arahidonic este eliberat din fosfolipide sub acţiunea fosfoli-

pazei A_2 (cu specificitate pentru restul de acid gras din poziţia 2 a fosfatidelor). O etapă importantă în sinteza prostaglandinelor primare, PGE sau PGF (fig. XIII.1), conduce la formarea de compuşi peroxidici (endoperoxizi, PGG_2 şi PGH_2) sub acţiunea unei ciclo-oxigenaze. De la aceşti endoperoxizi se formează, pe lîngă prostaglandinele PGE_2 şi PGF_2, alte două substanţe active,

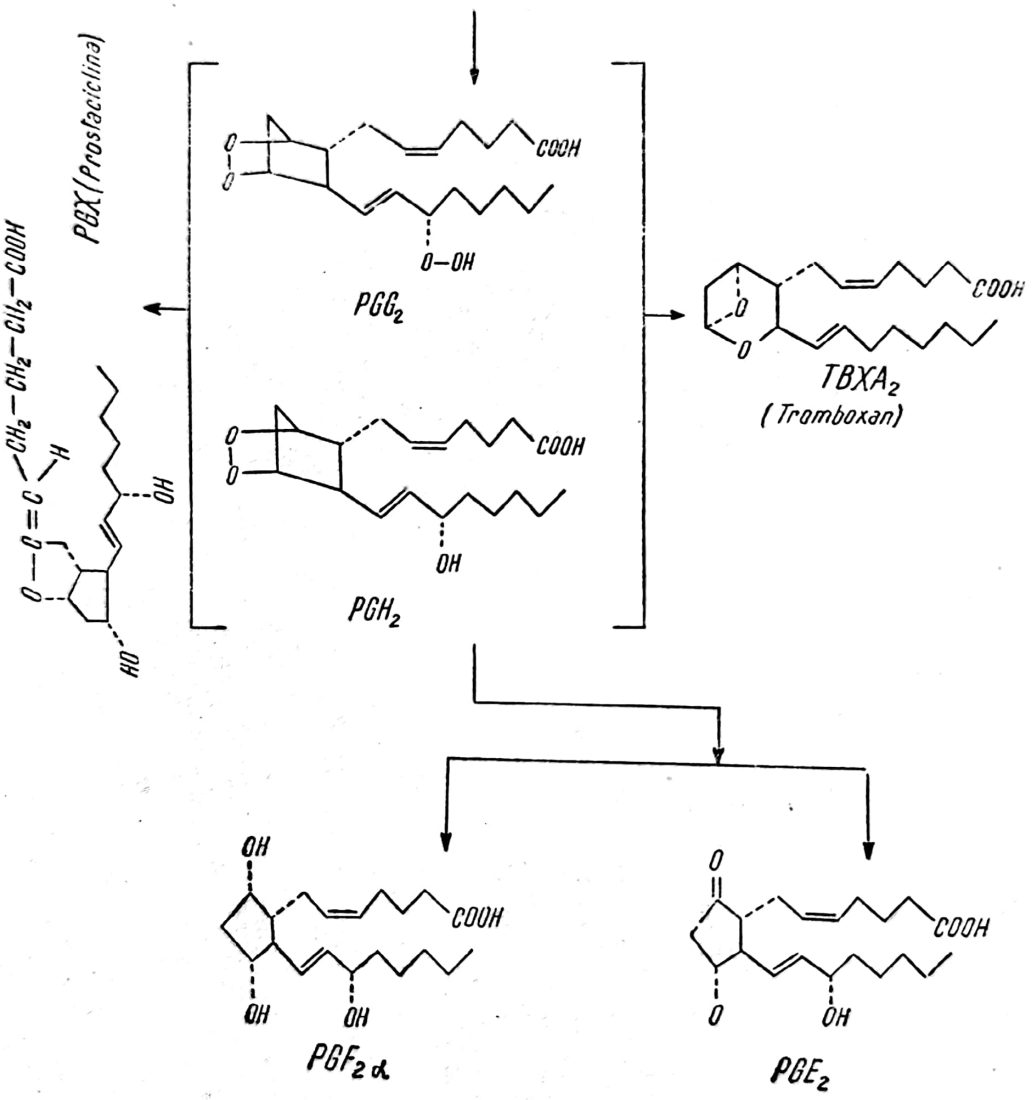
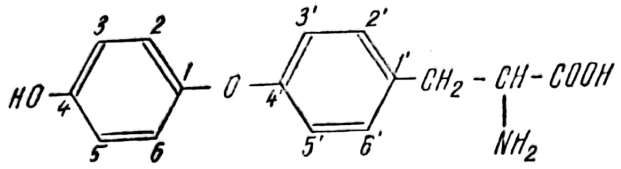


Fig XIII.1. Schema sintezei de prostaglandine.

tromboxanul A_2 ($TBXA_2$) şi prostaciclina (PGX). Aceşti compuşi alcătuiesc un sistem de control homeostatic al tonusului vaselor sanguine, tromboxanul A_2 stimulează contracţia musculaturii netede, pe cînd prostaciclina are acţiune relaxantă. De asemenea, aceşti compuşi determină agregarea trombocitelor ($TBXA_2$) sau inhibă agregarea (PGX) jucînd un rol important în formarea trombusului. Se consideră că indiferent de etiopatogenie, în majoritatea bolilor vasculare, evenimentul ultim, fatal, este tromboza.

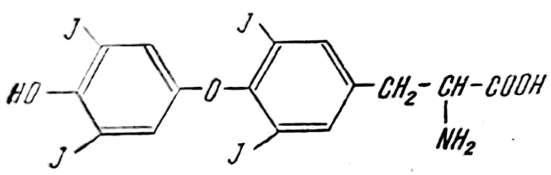
2. HORMONII TIROIDIENI

Chimie. Hormonii tiroidieni, tiroxina şi tritul, sînt derivaţi ioduraţi ai unui compus ipotetic, **tironina**, care rezultă virtual din două molecule de tirozină:

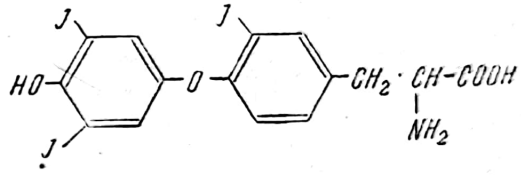


tironină

Tiroxina este **3,5,3′,5′-tetraiodotironină** (T_4); iar tritul cuprinde un atom de iod mai puţin, este **3,5,3′-triiodotironina** (T_3):



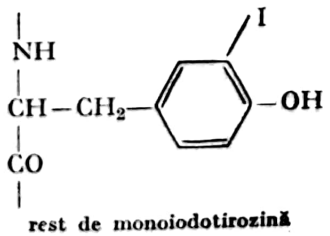
tiroxină



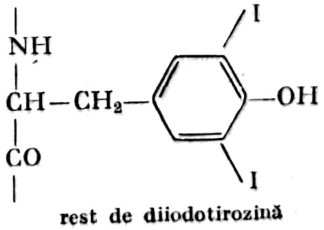
trit

Activitatea biologică este dependentă de prezenţa celor doi atomi de iod în nucleul extern prin care hormonii se fixează pe receptorii celulari. Tritul este sintetizat şi în ţesuturile periferice prin deiodurarea tiroxinei.

Biosinteză. Prezenţa iodului în moleculele hormonilor tiroidieni face ca funcţia tiroidei să fie corelată cu metabolismul iodului. În tiroidă iodul se află ca anioni (I^-), iod elementar (I_2) şi ca iod organic, legat de o proteină — tireoglobulina. Iodul, sub formă de ioduri, este furnizat organismului de apa de băut, de iodurile ce impurifică în general sarea de bucătărie şi de alte alimente. Anionii I^- străbat nucoasa intestinală şi din plasmă sînt captaţi de tiroidă printr-un transport activ, energodependent, care realizează o concentraţie a iodului în tiroidă de aproximativ 50 de ori mai mare decît în plasmă. Urmează apoi oxidarea anionilor la iod elementar ($2I^- \rightarrow I_2 + 2\ e$) sub acţiunea unei peroxidaze. Moleculele de iod, probabil fără a fi eliberate din centrul activ al peroxidazei, iodurează tireoglobulina (organificarea iodului). Această proteină (cu o greutate moleculară de 660 000 daltoni) cuprinde 115 resturi de tirozină per moleculă şi iodul se leagă în poziţiile 3 şi 5 ale resturilor tirozil, dînd naştere la monoiodotirozină şi diiodotirozină (în legături peptidice cu alţi aminoacizi):

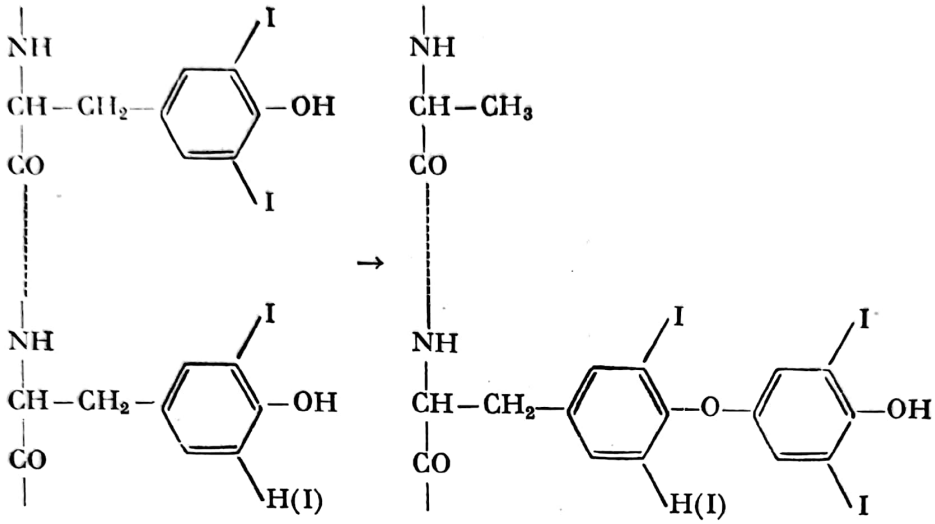


rest de monoiodotirozină



rest de diiodotirozină

Prin transferul unui rest de tirozină iodurată pe un alt rest se formează iodotironine ancorate în lanţurile polipeptidice ale tireoglobulinei. Prin interacţiunea dintre o moleculă de monoiodotirozină şi una de diiodotirozină se formează trit; două molecule de diiodotirozină dau naştere la tiroxină. Această etapă a sintezei hormonilor tiroidieni poate fi arătată schematic, astfel:

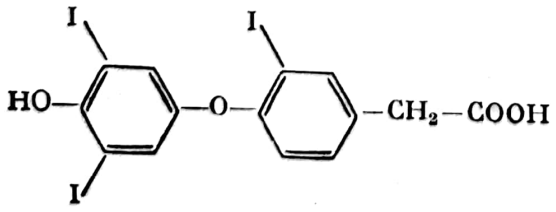


Iodotironinele biologic active rezultă prin hidroliza tireoglobulinei sub acţiunea unor peptidaze lisosomiale. Sînt eliberate totodată monoiodotirozina şi diiodotirozina alături de ceilalţi aminoacizi. Din tirozinele iodurate, iodul este pus în libertate ca anioni I^- care reintră în fluxul metabolic al iodului tiroidian.

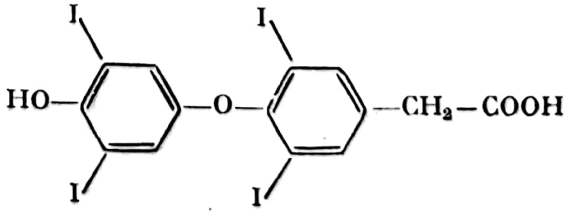
Transport. Tiroxina şi tritul eliberate de tireoglobulină sînt secretate în circulaţia generală. În sînge iodotironinele sînt legate de proteine plasmatice şi cantitatea de hormoni tiroidieni circulanţi se evaluează prin măsurarea iodului legat de proteine. Proteinele vectoare sînt o globulină cu mobilitate electroforetică intermediară între cea a α_1- şi α_2-globulinelor (thyroxine-binding globulin), o fracţiune prealbuminică ((thyroxine-binding prealbumin) şi însăşi serumalbumina. Acţiunile biologice sînt exercitate numai de iodotironinele libere care reprezintă numai o mică fracţiune din hormonii tiroidieni plasmatici. Tritul se află într-o cantitate mult mai mică decît tiroxina, fiind însă mai slab legat de proteine, are o activitate biologică mai mare decît tiroxina, un *turnover* mai rapid. Viaţa biologică medie a tiroxinei este de 6—8 zile şi a tritului de numai 2—3 zile.

Metabolism şi excreţie. În ţesuturile periferice suferă mai multe genuri de reacţii prin care sînt inactivaţi sau transformaţi în forme excretabile.

Prin transaminare rezultă acizi iodotiropiruvici care după o decarboxilare oxidativă dau naştere la acizi iodotiroacetici:



acid triiodotiroacetic



acid tetraiodotiroacetic

Aceşti compuşi ioduraţi mai păstrează unele din acţiunile biologice ale hormonilor tiroidieni şi sînt utilizaţi la corectarea hipotiroidismului.

Deiodurarea completă a hormonilor tiroidieni este un mecanism de inactivare şi de conservare a iodului. Transformarea tiroxinei în trit se crede că ar fi obligatorie, tritul fiind adevăratul hormon tiroidian. Tiroxina ar juca rolul unui rezervor tisular de hormon.

O fracţiune din hormonii tiroidieni sînt secretaţi prin bilă ca glucurono- şi sulfo-conjugaţi. În intestin conjugaţii sînt hidrolizaţi şi iodotironinele sînt parţial reabsorbite.

Controlul funcţiei tiroidiene şi secreţia de iodotironine. Sinteza şi secreţia de hormoni tiroidieni se află sub controlul unui sistem feed-back negativ la care participă hormonul tireotrop hipofizar (TSH) şi hormonul hipotalamic de eliberare (TSH-RH). Cînd scade concentraţia hormonilor tiroidieni plasmatici hipotalamusul secretă hormonul de eliberare a TSH-ului care ajungînd prin sistemul port la hipofiză stimulează eliberarea tropinei în circulaţie. TSH-ul ajungînd la nivelul tiroidei declanşează secreţia de iodotironine. Concentraţiile crescute de hormoni tiroidieni ce rezultă prin stimulare tireotropă inhibă atît secreţia hipofizară de TSH cît şi pe cea hipotalamică de TSH-RH. Se crede că numai tritul participă la mecanismul de reglare a funcţiei tiroidiene. La nivelul tiroidei, hormonul hipofizar controlează toate etapele de sinteză a hormonilor tiroidieni, captarea şi oxidarea iodurilor, iodurarea tireoglobulinei, hidroliza tireoglobulinei. Deficienţa cronică de iod în alimente şi concentraţiile mai reduse de iodotironine determină o stimulare intensă prin TSH al cărei rezultat este hipertrofierea tiroidei (guşa) pentru a compensa deficienţa de sinteză a hormonilor tiroidieni. Între anumite limite dezvoltarea trofică a glandei şi creşterea capacităţii ei secretorii menţin organismul într-o stare de eutiroidie.

Activitate biologică. Pe animale întregi hormonii tiroidieni au o acţiune bifazică, anabolică şi catabolică, în funcţie de doza şi de starea metabolică a animalului. Dozele mici, fiziologice, aplicate unui organism hipotiroidian au un efect trofic, de creştere a greutăţii corporale prin stimularea generală a sintezei de proteine. La doze mai mari, farmacologice, care realizează concentraţii plasmatice net superioare celor normale, hormonii tiroidieni exercită acţiuni aparent opuse celor de mai sus. Are loc o accelerare a arderilor tisulare, creşte consumul de oxigen, creşte viteza metabolismului bazal, diminuează depozitele de rezerve energetice glucidice şi lipidice, catabolismul proteic este intensificat (bilanţul azotat se negativează).

Acţiunea catabolică, calorigenă, exprimă rolul reglator al hormonilor tiroidieni asupra proceselor mobilizatoare de energie din organism. Nu se cunoaşte încă mecanismul primar de acţiune, experienţele in vitro au furnizat date contradictorii greu de interpretat în mod unitar. Accelerarea oxidaţiilor celulare poate să rezulte prin:

— creşterea numărului de mitocondrii şi a dimensiunilor membranelor interne mitocondriale;

— diminuarea gradului de cuplare a fosforilărilor oxidative mitocondriale;

— creşterea raportului ADP/ATP mitocondrial prin accelerarea influxului de ADP şi a efluxului de ATP;

— stimularea ATP-azei, Na^+- şi K^+-dependentă, component al „pompei de sodiu";

Scanned with OKEN Scanner

— stimularea sintezei de coenzime redox, coenzima Q, coenzime flavinice (FMN, FAD) şi piridinice (NAD, NADP);

— creşterea concentraţiei 2,3-difosfogliceratului eritrocitar, ceea ce facilitează eliberarea oxigenului din $Hb\text{-}O_2$; oxigenarea mai bună a ţesuturilor accelerează reacţiile de oxidare.

Raportul dintre efectele anabolice şi cele calorigene ale hormonilor tiroidieni sînt neclare. Manifestarea acestor acţiuni necesită o perioadă de latenţă de cîteva zile, fapt ce sprijină ideea că hormonii tiroidieni acţionează prin inducţia sintezei proteice. La dozele mici se evidenţiază o stimulare generală nespecifică (efect trofic). La doze mai mari receptivitatea deosebită a unor ţesuturi, a unor sisteme celulare, faţă de hormonii tiroidieni determină sinteza preferenţială a unor proteine implicate într-o etapă sau alta a calorigenezei.

Patologia tiroidiană. Expresia clinică a hipotiroidismului depinde atît de gradul deficienţei, cît şi de vîrsta la care se instalează. Hipofuncţia tiroidiană severă instalată în perioada prenatală sau imediat după naştere determină tulburări de creştere şi dezvoltare (nanism hipotiroidian), diminuarea funcţiilor neuro-psihice (cretinism). La adult deficienţa în hormoni tiroidieni se exprimă prin scăderea metabolismului bazal, a temperaturii corporale, prin sensibilitate la frig, diminuarea vigorii fizice şi psihice, tulburări cardiovasculare, infiltrarea cu apă a tegumentelor (mixedem).

Hipertiroidismul, rezultat al hipersecreţiei de hormoni tiroidieni, asociat frecvent cu hipertrofierea glandei (guşă), are ca semn caracteristic exoftalmia (guşa exoftalmică sau boala Graves-Basedow). Tulburarea se manifestă prin creşterea metabolismului bazal, creşterea temperaturii corporale, transpiraţie, tahicardie şi tulburări de ritm cardiac, nervozitate. În etiopatologia bolii Graves-Basedow este incriminat un factor stimulator al tiroidei, distinct de tireotropina hipofizară, denumit LATS (de la long-acting thyroid stimulator).

3. PARATHORMONUL ŞI CALCITONINA

Parathormonul este produsul activităţii endocrine a glandelor paratiroide. Calcitonina (sau tireocalcitonina), un al doilea hormon cu rol în homeostazia calciului plasmatic, este elaborat şi secretat de celule specializate (celule C) răspîndite printre celulele foliculare din tiroidă, paratiroidă, timus.

3.1. PARATHORMONUL

Chimie. Hormonul paratiroidian este o proteină mică, alcătuită dintr-un lanţ polipeptidic cu 84 resturi aminoacidice (fig. XIII.2).

Hormonii de la diverse specii diferă doar prin cîţiva aminoacizi. Activitatea biologică este localizată în segmentul N-terminal cuprinzînd 29 pînă la 34 aminoacizi. Hormonul este elaborat sub forma unui prohormon cuprinzînd 6 aminoacizi suplimentari şi după îndepărtarea lor prin proteoliză, polipeptidul dobîndeşte activitate hormonală.

Activitate biologică. Parathormonul joacă un rol important în reglarea metabolismului fosfocalcic, împreună cu vitamina D şi cu calcitonina. Mecanismul homeostatic pentru reglarea concentraţiei calciului ionizat în lichidele

Scanned with OKEN Scanner

extracelulare este atît de perfecţionat, încît calcemia este menţinută (la adult) între 9 şi 11 mg/100 ml.

Ţesuturile ţintă pentru parathormon sînt osul, rinichiul şi intestinul. Acţiunile hormonului la nivel osos şi intestinal sînt dependente de vitamina D.

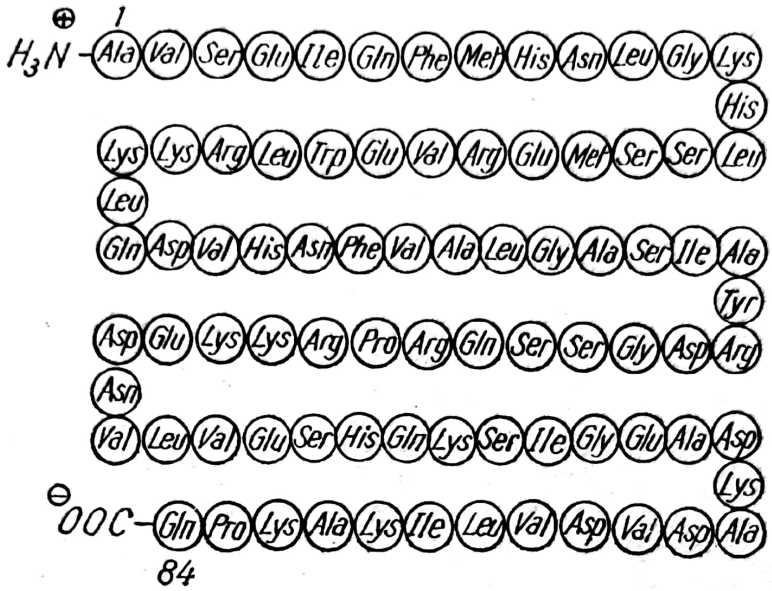


Fig. XIII.2. Structura parathormonului.

Probabil că parathormonul acţionează şi asupra altor ţesuturi în care are loc transportul transmembranar de ioni Ca^{2+}, printr-un mecanism unic.

La nivelul osului, parathormonul accelerează procesul de resorbţie osoasă care constă în solubilizarea substanţei minerale, concomitent cu dislocarea matricei organice, alcătuită din colagen şi mucopolizaharide. Resorbţia osului determină, în principal, creşterea calcemiei. Fosfatemia nu creşte deoarece acţiunea fosfaturică a parathormonului compensează hiperfosfatemia consecutivă solubilizării hidroxil-apatitei. Dislocarea substanţei organice a osului se evidenţiază prin eliberarea în plasmă şi eliminarea urinară crescută de hidroxiprolină şi de hexozamine, componente specifice ale colagenului şi respectiv ale mucopolizaharidelor. Acţiunea resorbtivă a hormonului paratiroidian rezultă prin activarea osteoclastelor. După unii autori resorbţia debutează printr-o scădere de pH care dizolvă hidroxil-apatita sau după alţii, prin acţiunea unor factori colagenolitici elaboraţi de osteoclaste, dislocarea colagenului precedînd solubilizarea substanţei minerale.

La nivelul rinichiului parathormonul are în primul rînd o acţiune fosfaturică, creşte eliminarea renală de fosfaţi prin scăderea reabsorbţiei şi/sau accentuarea secreţiei tubulare. Excreţia renală de calciu este diminuată prin creşterea reabsorbţiei tubulare. Rolul fiziologic al acestei ultime acţiuni este probabil redus, întrucît reabsorbţia calciului este foarte eficientă şi în absenţa hormonului. Efectele osoase ale parathormonului sînt independente de cele asupra rinichiului. Acţiunea resorbtivă asupra osului se manifestă şi la animale nefrectomizate sau în culturi de celule osoase.

La nivel intestinal parathormonul activează absorbţia ionilor Ca^{2+}. El intervine indirect prin stimularea sintezei renale de 1,25-dihidroxicolecalciferol (prin hidroxilarea 25-hidroxicalciferolului), forma activă a vita-

Scanned with OKEN Scanner

minei D. Derivatul dihidroxilat al calciferolului induce sinteza unei proteine transportoare de Ca^{2+}, accelerîndu-se tranzitul ionic prin mucoasa intestinală.

Controlul secreţiei de parathormon. Activitatea secretoare a paratiroidei este reglată printr-un mecanism de feed-back negativ, agentul reglator homeostatic fiind concentraţia ionilor Ca^{2+} în lichidele extracelulare. O scădere a calcemiei declanşează eliberarea de parathormon cu acţiune hipercalcemiantă.

Patologia paratiroidiană. Hipoparatiroidismul este cauzat frecvent de lezarea sau extirparea paratiroidelor în cursul tiroidectomiilor. Evoluează cu hipocalcemie şi hiperfosfatemie şi se manifestă printr-o creştere a excitabilităţii neuromusculare (tetanie): amorţeli, palpitaţii, spasme vasculare şi viscerale, convulsii.

Pseudohipoparatiroidismul (boala von Albright) este o tulburare genetică datorită absenţei sau deficienţei receptorilor tisulari pentru parathormon. Concentraţia plasmatică a hormonului este normală. Se manifestă prin hiperexcitabilitate neuromusculară, deformări scheletice, întîrziere mintală.

Hiperparatiroidismul (osteita fibro-chistică) este caracterizată prin creşterea calcemiei, scăderea fosfatemiei, diminuarea eliminării renale de calciu şi creşterea eliminării de fosfaţi. Absorbţia calciului intestinal este accelerată. Amplificarea efectelor resorbtive asupra osului are ca rezultat demineralizarea oaselor, fracturi, deformări scheletice. Calcemia crescută determină calcifieri ale ţesuturilor moi (rinichi, miocard, stomac, plămîni), calcifierea capsulelor articulare, a tendoanelor.

3.2. CALCITONINA

Este un polipeptid cuprinzînd 32 resturi aminoacidice (fig. XIII.3).

Calcitonina antagonizează efectele parathormonului, are acţiune hipocalcemiantă. La nivelul osului intervine prin blocarea resorbţiei osoase; prin inhibiţia sintezei de 1,25-dihidroxicolecalciferol diminuează absorbţia intestinală de calciu. La concentraţii mai mari creşte eliminarea renală de Ca^{2+} şi Mg^{2+}.

Efectele calcitoninei asupra calcemiei sînt mai reduse decît cele determinate de parathormon, dar se instalează mai rapid şi au o durată mai scurtă.

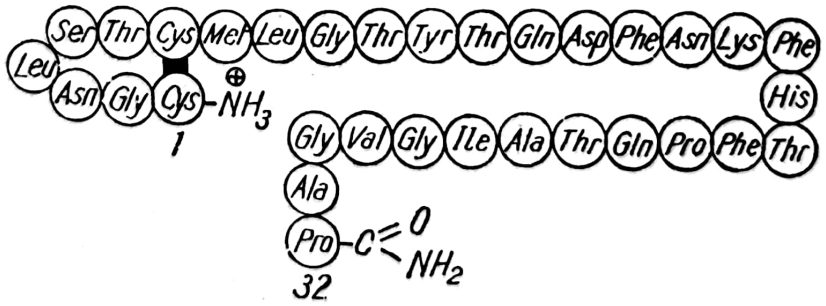


Fig. XIII.3. Structura calcitoninei.

Timpul de înjumătăţire al calcitoniei este mai mic decît al parathormonului, de numai 4—12 minute. Rolul fiziologic al calcitoninei este acela de a corecta rapid variaţiile foarte mici ale calcemiei.

Scanned with OKEN Scanner

4. HORMONII PANCREATICI

Activitatea endocrină a pancreasului este localizată în insulele Langerhans. Celulele β secretă insulină, iar cele α, glucagonul.

4.1. INSULINA

Chimie. Insulina este o proteină mică, cu o greutate moleculară de aproximativ 6 000. Este alcătuită din două lanţuri peptidice, un lanţ (A) cu 21 aminoacizi şi altul (B) cu 30 aminoacizi, reuniţi prin două punţi disulfurice. O a treia punte — S—S — este situată în lanţul A (fig. XIII.4). Insulinele izolate la diverse specii diferă prin unele resturi de aminoacizi, dar activitatea lor biologică este aceeaşi. Insulina de porc are structura cea mai apropiată de cea a hormonului uman, de care diferă numai prin aminoacidul C-terminal al lanţului B. La porc acest aminoacid este alanină, iar la om este treonina. În terapeutică se utilizează cel mai mult insulina de porc din care restul C-terminal de alanină a fost îndepărtat pentru a scădea antigenicitatea preparatului.

În prezenţa ionilor Zn^{2+} insulina formează agregate, uşor cristalizabile, a căror mărime variază după concentraţia metalului. Insulina plasmatică se află sub formă de dimeri sau tetrameri. Nu se cunoaşte gradul de agregare a insulinei celulelor β-insulare.

Insulina este sintetizată iniţial sub forma unui precursor — proinsulină — polipeptid alcătuit din 84 aminoacizi. În proinsulină lanţurile A şi B ale viitoarei molecule de insulină sînt reunite printr-un segment cu 33 aminoacizi (peptid de legătură) care leagă capătul C-terminal al lanţului B de cel N-terminal al lanţului A (fig. XIII.5). Prin detaşarea hidrolitică a peptidului de legătură, rezultă insulina. Legăturile disulfurice din insulină sînt indispensabile pentru activitatea hormonală, ele asigură moleculei o anumită conformaţie necesară interacţiunii cu receptorii membranei plasmatice. Lanţurile

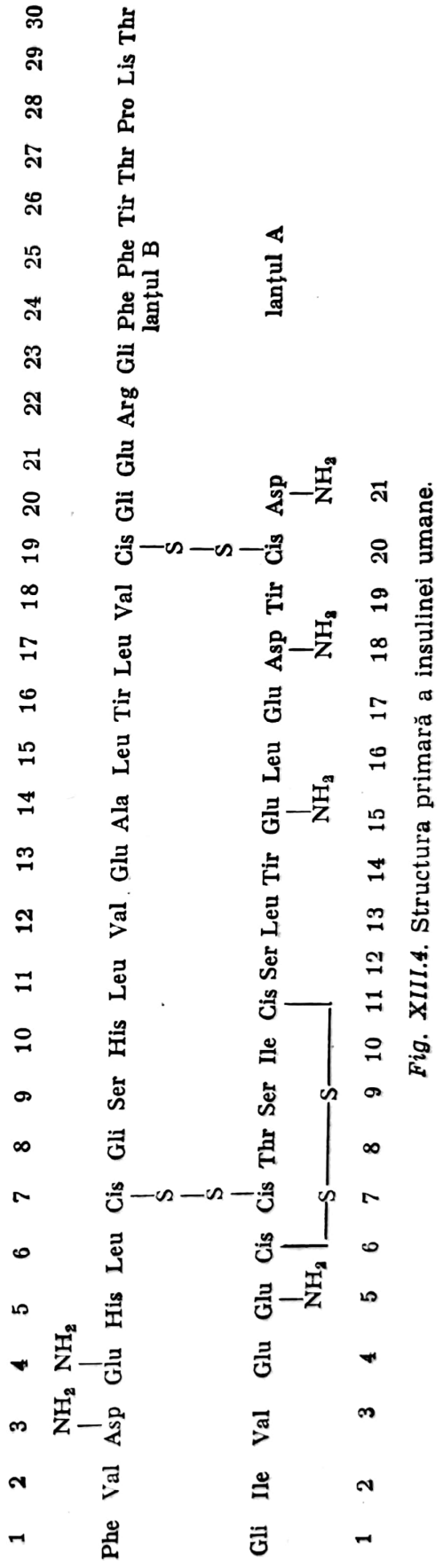


Fig. XIII.4. Structura primară a insulinei umane.

A şi B izolate nu pot da naştere insulinei active, legăturile disulfurice nu se stabilesc în poziţiile corecte. Din contră, proinsulina redusă (cu grupări —SH) prin tratare cu agenţi oxidanţi slabi (care refac legăturile —S—S—) redobîndeşte conformaţia nativă. Rezultă că peptidul de legătură este necesar pentru un supliment de complexitate structurală indispensabil organizării spaţiale a moleculei.

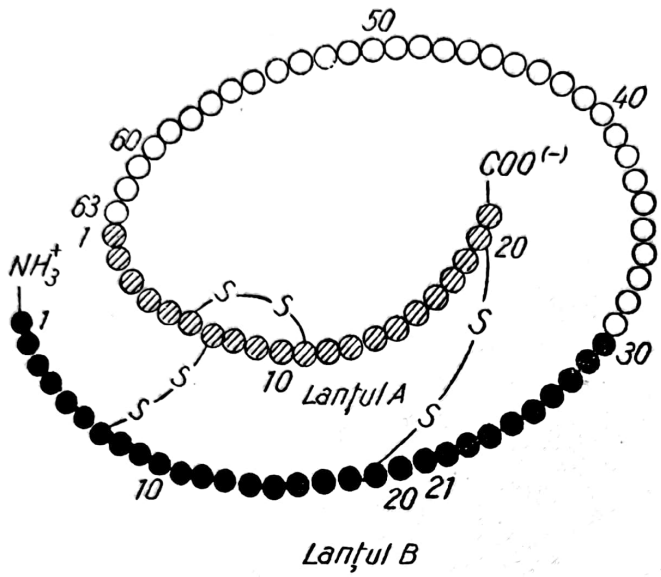


Fig. XIII.5. Structura proinsulinei.

Transport şi metabolism. Insulina sub formă de dimer şi tetramer circulă în plasmă liberă, neasociată cu alte proteine. Timpul de înjumătăţire al insulinei circulante este de 20 minute. Inactivarea are loc în principal în ficat, muşchi, rinichi şi constă în desfacerea legăturilor disulfurice sub acţiunea glutation-insulin transhidrogenazei care desfăcînd punţile disulfurice eliberează lanţurile A şi B:

$$\text{insulină} + 4\,GSH \rightarrow \text{lanţ A} + \text{lanţ B} + 2\,G{-}S{-}S{-}G$$

Lanţurile A şi B izolate sînt supuse mai departe acţiunii enzimelor proteolitice celulare.

Activitate biologică. Insulina controlează procesele fundamentale de stocare şi de mobilizare a rezervelor calorice, permite adaptarea metabolică a organismului la trecerea de la starea de nutriţie la starea de post. Insulina acţionează în special la animalele care se hrănesc intermitent, este mai puţin importantă pentru animalele care primesc hrana continuu (ierbivore). În perioadele de alimentare insulina favorizează depozitarea excesului caloric sub formă de glicogen, lipide şi proteine. În perioadele de post aceste rezerve sînt mobilizate prin reacţii foarte fin modulate încît utilizarea lor să se facă fără pierderi.

Efectele fiziologice ale insulinei sînt rezultatul permeabilizării membranelor unor clase de celule pentru glucoză, dar şi pentru aminoacizi, ioni K^+, $H_2PO_4^-$. Membranele celulelor din diverse ţesuturi diferă în ceea ce priveşte permeabilitatea lor pentru glucoză. Unele sînt traversate liber de glucoză şi sînt insensibile la insulină. În alte celule transportul transmembranar de glucoză este mediat de insulină. Ţesuturile dependente de insulină sînt: muşchii scheletici, miocardul, ţesutul adipos, osul, cartilajele, leucocitele, glanda mamară în lactaţie. Ţesuturi independente de insulină sînt: creierul, hematiile, rinichiul, intestinul. Ţinînd seama de proporţia ţesutului muscular şi adipos faţă de ţesuturile metabolic active ale organismului, rezultă că insulina controlează într-o măsură considerabilă utilizarea glucozei.

Membrana plasmatică a celulelor insulino-sensibile cuprinde proteine receptoare care interacţionînd cu insulina suferă modificări conformaţionale şi, direct sau prin intermediul unui sistem transducţional, alterează activi-

tatea unor enzime. Insulina nu pătrunde în interiorul celulelor. Ţinînd seama de promptitudinea răspunsurilor celulare la insulină, este puţin probabil că hormonul interferează cu aparatul de sinteză proteică. Modificările cantitative ale unor enzime după administrare de insulină sînt efecte mai tardive, răspunsuri de adaptare la noile condiţii metabolice determinate de acţiunile imediate, primare ale insulinei.

Intervenţia insulinei la nivelul muşchilor scheletici are ca rezultat creşterea vitezei de utilizare a glucozei pe diverse căi metabolice: degradare oxidativă, depozitare de glicogen sau conversia sa în aminoacizi şi depozitarea sub formă de proteine. Ţesutul asupra căruia insulina exercită efectele cele mai importante este cel adipos. Prin facilitarea transportului de glucoză în adipocite, insulina influenţează atît depozitarea cît şi mobilizarea rezervelor lipidice. Insulina are acţiune lipogenetică, stimulează sinteza şi depozitarea trigliceridelor, furnizînd adipocitelor glicerol-fosfat. Totodată insulina exercită o acţiune antilipolitică independentă de transportul glucozei. În absenţa insulinei, ţesutul adipos este inapt de a capta glucoză din lichidele extracelulare şi în lipsa glicerol-fosfatului echilibrul lipogeneză⇌lipoliză este deplasat în favoarea celui de al doilea proces, glicerolul şi acizii graşi trec în sînge. Creşterea concentraţiei acizilor graşi liberi din plasmă este tulburarea metabolică cea mai gravă în hipoinsulinism.

Membrana hepatocitului este permeabilă pentru glucoză, totuşi insulina exercită la nivelul ficatului acţiuni cu răsunet în întreg organismul. Insulina intensifică utilizarea hepatică a glucozei, arderea ei drept substrat energetic, depunere sub formă de glicogen, de grăsimi, de proteine. În prezenţa insulinei gluconeogeneza din aminoacizi este diminuată. Rezultatul global al acestor efecte metabolice este scăderea efluxului hepatic de glucoză, ficatul în aceste condiţii captează glucoză din lichidele extracelulare. Efectele hepatice ale insulinei pot fi explicate prin stimularea sintezei de glucokinază şi de represia sintezei enzimelor gluconeogenetice. Totuşi, modificările metabolismului hepatic, induse de insulină, pot fi datorate, cel puţin în parte, alterării concentraţiilor plasmatice ale unor metaboliţi prin acţiunea insulinei asupra ţesuturilor extrahepatice.

Controlul secreţiei. Eliberarea insulinei din celulele insulare este controlată de nivelul glicemiei. Debitul secreţiei de insulină este proporţional cu cantitatea de glucoză ce traversează pancreasul. Se pare că nu glucoza însăşi ci un metabolit al ei exercită efectele stimulatoare asupra insulelor, deoarece inhibitorii metabolismului glucozei inhibă şi eliberarea de insulină. În afară de glucoză, mulţi alţi factori influenţează secreţia insulinică. Glucagonul, hormonul de creştere, ACTH-ul, aminoacizii plasmatici (în special leucina şi arginina) stimulează secreţia; adrenalina, somatostatina (factorul de inhibiţie a eliberării hormonului de creştere, GH-RIH) inhibă secreţia de insulină. Hormonii gastro-intestinali (secretina, gastrina, pancreozimina) stimulează eliberarea de insulină înainte de creşterea glicemiei. Hiperglicemia postprandială întreţine apoi secreţia insulinică mai mult timp.

Diabetul zaharat. Deficienţa insulinică relativă în raport cu nevoile organismului determină tulburări metabolice ce caracterizează starea diabetică (diabetul zaharat). La tineri diabetul este rezultatul hipofuncţiei pancreatice (diabet juvenil), pe cînd starea diabetică a adultului este mai degrabă determinată de diminuarea răspunsului la insulină al celulelor ţintă (prin dereglări

Scanned with OKEN Scanner

ale sintezei receptorilor insulinici, ale mecanismului de transmitere intracelulară a mesajului hormonal etc.).

Utilizarea defectuoasă a glucozei de către ţesuturile periferice — muşchi şi ţesut adipos — determină hiperglicemie, glucozurie şi multiple tulburări ale metabolismului lipidic şi proteic. Hiperglicemia primară, prin scăderea transportului transmembranar de glucoză în ţesuturile insulino-sensibile, este amplificată ulterior prin gluconeogeneză hepatică din aminoacizi şi glicerol.

Metabolismul proteic este afectat prin intensificarea proteolizei în muşchi şi ficat (creşte aminoacidemia), accelerarea catabolismului aminoacizilor (ureogeneza crescută), conversiunea catenelor hidrocarbonate ale aminoacizilor în glucoză (hiperglicemie).

Hipoinsulinismul perturbă într-o măsură considerabilă metabolismu lipidic. Lipoliza în ţesutul adipos este intensificată cu creşterea consecutivă a concentraţiei plasmatice a acizilor graşi liberi şi a glicerolului. Acesta din urmă este utilizat în ficat ca substrat gluconeogenetic (hiperglicemie). Acizii graşi la nivelul ficatului sînt parţial reîncorporaţi în trigliceride ce sînt exportate spre ţesuturile periferice ca lipoproteine cu densitate foarte mică (hiperlipemie cu hiperlipoproteinemie); altă fracţiune din acizii graşi suferă β-oxidare cu producţie de acetil-CoA. Excesul de acetil-CoA este dirijat spre cetogeneză (hipercetonemie, cetonurie) şi spre sinteză de colesterol (hipercolesterolemie).

Dacă aceste dereglări nu sînt corectate sau compensate prin controlul aportului exogen caloric şi glucidic şi prin administrare de insulină şi/sau agenţi hipoglicemianţi, se ajunge la cetoacidoză diabetică, la moarte.

Hiperinsulinismul. Tumorile pancreatice insulare sau supradozarea cu insulină în tratamentul diabetului determină hipoglicemii severe, care pot fi corectate imediat prin administrare de glucoză (oral sau intravenos). Glucagonul, prin accelerarea glicogenolizei şi a efluxului hepatic de glucoză, este foarte eficient în tratamentul hipoglicemiilor.

4.2. GLUCAGONUL

Chimie. Glucagonul este un polipeptid alcătuit din 29 aminoacizi (fig. XIII.6). Porţiunile superioare ale tractului gastro-intestinal secretă un polipeptid cu activitate similară cu a glucagonului.

Activitate biologică. Acţiunile metabolice ale glucagonului sînt opuse celor ale insulinei: este hiperglicemiant şi determină creşterea concentraţiei

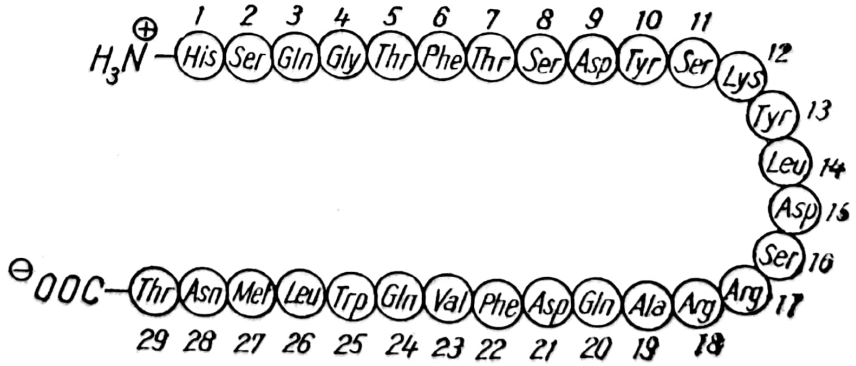


Fig. XIII.6. Structura glucagonului.

Scanned with OKEN Scanner

acizilor graşi liberi din plasmă. Hiperglicemia indusă de glucagon este rezultatul degradării glicogenului hepatic prin activarea glicogen fosforilazei. Acţiunea hiperglicemiantă nu se observă decît în cazul în care ficatul cuprinde depozite de glicogen. Glucagonul este fără efect asupra glicogenului muscular, prin aceasta deosebindu-se de adrenalină care accelerează atît glicogenoliza hepatică, cît şi pe cea musculară. La nivelul ţesutului adipos glucagonul are acţiune lipolitică (sinergică cu a adrenalinei) prin activarea trigliceridolipazei (lipaza hormon-sensibilă) şi rezultatul acestei acţiuni este creşterea nivelului plasmatic al acizilor graşi liberi.

Rolul biologic al glucagonului constă în reglarea fină a glicemiei. Hiperglicemia indusă de glucagon se instalează rapid dar este de foarte scurtă durată. Glucagonul acţionează la nivel celular prin intermediul adenil-ciclază — AMP-ciclic şi efectele sale sînt resimţite imediat.

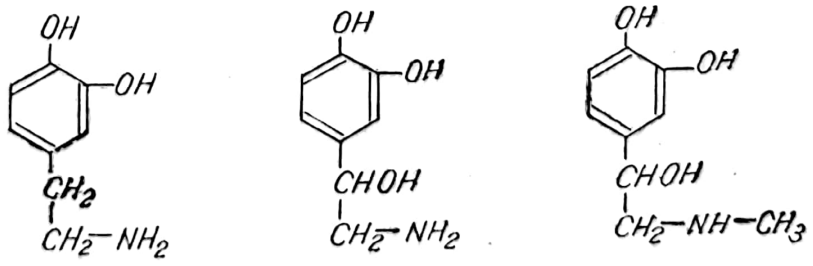
Controlul secreţiei. Secreţia de glucagon este reglată prin concentraţia glucozei sanguine. Hipoglicemia determină secreţia hormonului iar hiperglicemia consecutivă blochează eliberarea sa. Reprimarea secreţiei de glucagon prin hiperglicemie este dependentă de prezenţa insulinei (celulele α insulare sînt probabil insulino-sensibile). Acest fapt are o importanţă deosebită în etiologia stării diabetice, dereglărilor metabolice determinate de hipoinsulinism şi se adaugă şi acelea ale unei hipersecreţii de glucagon (exacerbarea glicogenolizei hepatice şi a lipolizei).

Aminoacidemia crescută determină de asemenea stimularea secreţiei de glucagon, arginina fiind aminoacidul cel mai eficient. Adrenalina amplifică eliberarea de glucagon în opoziţie cu efectul inhibitor al acestui factor asupra celulelor insulare. Hormonul de inhibare a eliberării somatotropinei (GH-RIH, somatostatina) inhibă secreţia de glucagon.

5. HORMONII MEDULOSUPRARENALIENI

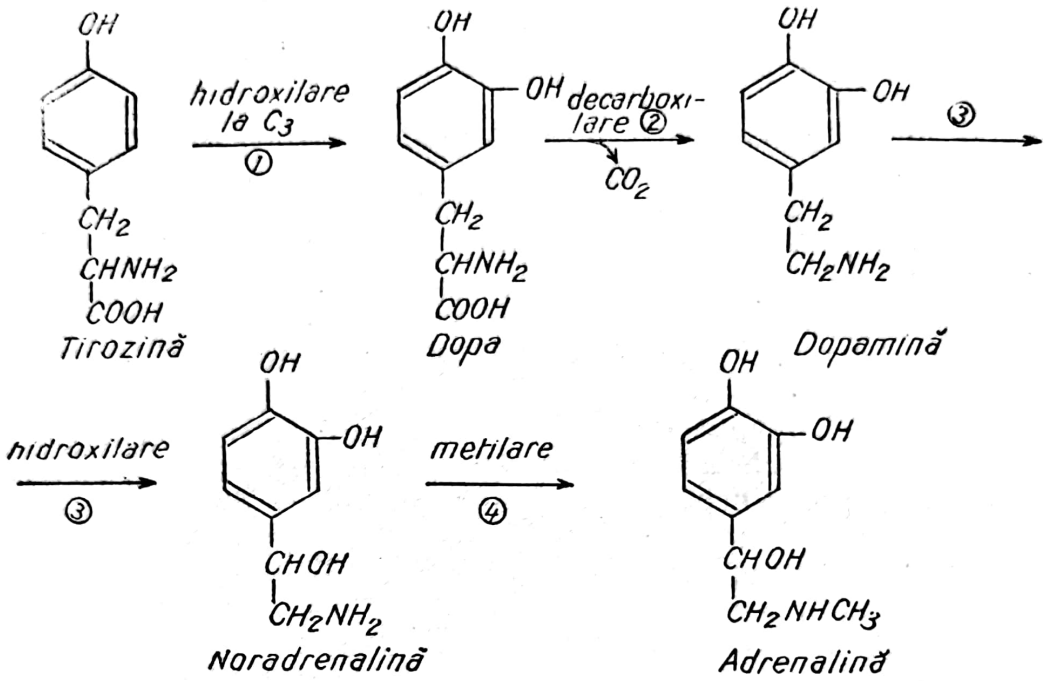
Glandele suprarenale (adrenalele) sînt alcătuite din două porţiuni distincte avînd origini, structuri şi funcţii diferite. Porţiunea corticală se dezvoltă din mezoderm şi are o structură epitelială, pe cînd medulara este de origine nervoasă. Hormonii elaboraţi de cortexul suprarenalei sînt steroizi (corticosteroizi), iar cei medulari sînt catecolaminele. Catecolaminele mai sînt sintetizate şi în terminaţiile nervoase (periferice şi centrale) avînd rolul de neurotransmiţători (sinapse adrenergice).

Chimie. Compuşii denumiţi catecolamine sînt adrenalina (epinefrina), noradrenalina (norepinefrina) şi dopamina. Ele au comun nucleul catecolului (orto-dihidroxi-benzen sau pirocatehină):



Dopamină Noradrenalină Adrenalină

Biosinteză. Catecolaminele sînt sintetizate pornindu-se de la aminoacidul tirozină prin secvenţa de reacţii:



Sinteza de catecolamine are loc în celule specializate, cromafine, din adrenale, în neuronii simpatici sau în celule cromafine dispersate în alte organe ca: plămîn, ficat, intestin. Primele două reacţii au loc în citoplasmă după care dopamina pătrunde în granulele cromafine ale celulelor, unde prin hidroxilare dă naştere la noradrenalină şi prin N-metilare (S-adenozil-metionina este donorul grupării metil) la adrenalină. Metilarea are loc numai în adrenale. Raportul dintre cantitatea de adrenalină şi noradrenalină în medulara de om este de aproximativ 4 : 1. Dopamina nu se acumulează în suprarenale şi este practic absentă în secreţia medulară. Dopamina întovărăşeşte în cantităţi mici noradrenalina în neuronii simpatici, în creier şi în celulele cromafine dispersate în celelalte ţesuturi.

Catecolaminele sînt depozitate în granulele cromafine în asociere cu proteine şi cu ATP (1 mol ATP/4 moli catecolamină). Hormonii sînt eliberaţi după stimulare nervoasă (vagală) printr-un proces Ca^{+2}-dependent.

Sîngele periferic cuprinde atît substanţele secretate de medulosuprarenală, cît şi pe acelea care scapă în circulaţie din terminaţiile nervoase. La un adult în repaus nivelul plasmatic al noradrenalinei (20 ng/100 ml) întrece cu mult pe cel al adrenalinei (5 ng/100 ml). Ablaţia bilaterală a medulosuprarenalei scade adrenalinemia dar afectează foarte puţin concentraţia noradrenalinei plasmatice.

Catabolism. Catecolaminele circulante sînt inactivate în ţesuturile periferice, în special în ficat (prin reacţiile arătate în fig. XIII.7). Prin metilare, sub acţiunea unei catecol-O-metil transferaze (COMT), noradrenalina formează normetanefrină, iar din adrenalină rezultă metanefrină. Aceşti compuşi sînt parţial eliminaţi prin urină (după glucuronare sau sulfoconjugare). Cea mai mare parte a derivaţilor metilaţi ai catecolaminelor suferă apoi acţiunea monoaminoxidazei (MAO) care dezaminează oxidativ funcţia aminică liberă (a noradrenalinei) sau pe cea metilată din adrenalină. Aldehida

Scanned with OKEN Scanner

rezultată este în continuare oxidată la acidul 3-metoxi-4-hidroximandelic (acid vanilin-mandelic), catabolitul principal al noradrenalinei și al adrenalinei, excretat ca sulfo- și glucurono-conjugat.

În terminațiile nervoase catabolismul catecolaminelor începe prin acțiunea monoaminoxidazei (MAO) și este încheiat în țesuturile periferice (ficat) prin metilare sub acțiunea metiltransferazei. Termenul final al acestei secvențe catabolice este tot acidul vanilin-mandelic. Activitatea monoaminoxidazei (MAO) reglează viața biologică și activitatea catecolaminelor în sistemul

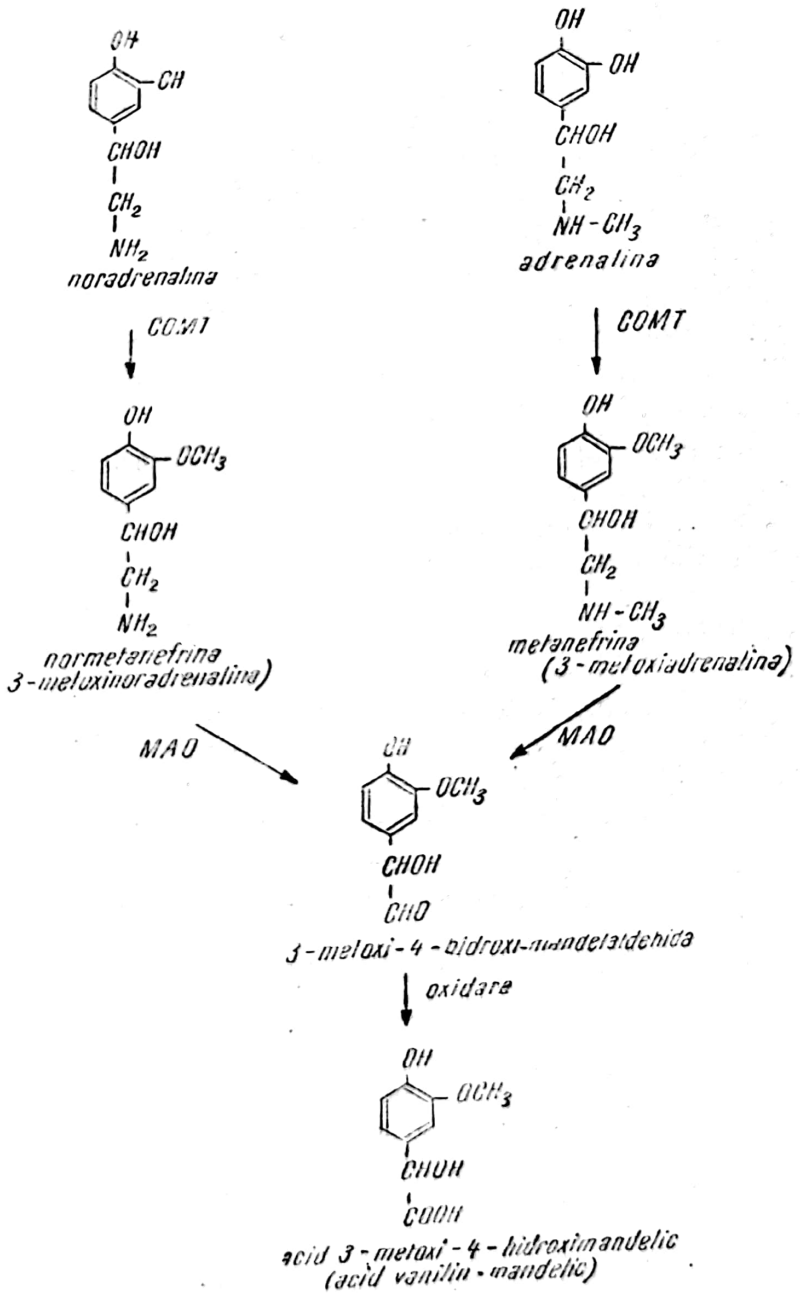


Fig. XIII.7. Catabolismul catecolaminelor circulante:
COMT=Catecol-O-metil transferază; MAO=monoamino-oxidază.

nervos și un număr mare de substanțe medicamentoase acționează prin modificarea activității acestei enzime.

Activitate biologică. Catecolaminele îndeplinesc două funcții importante:

— au efecte metabolice determinate de secreția medulară care cuprinde în special adrenalină;

— sînt mediatori ai transmisiunii nervoase la sinapsele sistemului nervos simpatic (sinapse adrenergice), noradrenalina fiind responsabilă de aceste efecte.

Acțiunile metabolice ale catecolaminelor constau în mobilizarea depozitelor de glicogen hepatic și muscular prin activarea glicogen-fosforilazei. Glicogenoliza hepatică determină creșterea glicemiei prin secvența de reacție:

glicogen → glucoză-1-P → glucoză-6-P → glucoză circulantă.

La nivelul mușchilor glicogenoliza furnizează glucoză-6-fosfat ca substrat energetic și acidul lactic care difuzează în sînge este reconvertit în glucoză contribuind și el la creșterea glicemiei (ciclul Cori).

În țesutul adipos adrenalina activează triglicerid-lipaza accelerînd hidroliza grăsimilor de rezervă la glicerol și acizi grași care difuzează în plasmă. Glicerolul devine substrat gluconeogenetic iar acizii grași sînt arși în mușchi pentru mobilizare de energie. Întrucît adrenalina inhibă secreția de insulină, utilizarea glucozei de către țesuturile insulino-sensibile este diminuată. Creierul, insulino-independent, are acces liber la glucoză.

Efectele metabolice ale catecolaminelor, în colaborare cu acelea hemodinamice determinate de descărcarea nervoasă adrenergică, pregătesc organismul pentru a răspunde la diverse agresiuni fizice sau psihice. Catecolaminele sînt denumite hormoni de apărare, secreția medulară este inițiată de diverși stimuli nervoși. Factori agresivi diverși (frig, emoții, traumatisme) declanșează secreția catecolaminelor din medulară. Acțiunea catecolaminelor este foarte rapidă dar de scurtă durată. Viața medie biologică a catecolaminelor este de cîteva minute. Medulosuprarenala nu este esențială pentru viață dar în absența secreției medulare organismul are o capacitate redusă de adaptare la agresiunile fizice sau psihice.

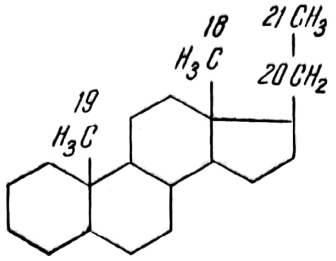
6. HORMONII CORTICOSUPRARENALIENI

Cortexul suprarenalei este o formațiune histologic distinctă de medulară. Este de natură epitelială și poate fi împărțită în trei zone, un strat exterior (zona glomerulară), unul median (zona fasciculată) și unul intern (zona reticulată). La om zona mediană este cea mai dezvoltată.

Hormonii corticali sînt înrudiți chimic cu cei sexuali (gonadele au aceeași origine embriologică) și aparțin familiei steroizilor. Corticosuprarenala elaborează un număr mare de steroizi dar substanțele secretate în mod normal în concentrații la care exercită acțiuni fiziologice sînt cortisolul (hidrocortizona) și aldosterona. Cortisolul aparține grupului de corticosteroizi cu acțiuni la nivelul metabolismului, glucocorticoizi; aldosterona influențează echilibrul hidro-salin, este un mineralocorticoid.

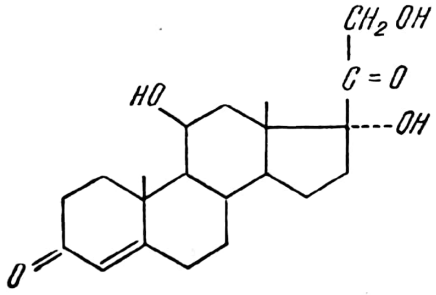
Scanned with OKEN Scanner

Chimie. Hormonii corticali sînt steroizi cu 21 atomi de carbon, derivaţi ai hidrocarburii ipotetice, pregnan:



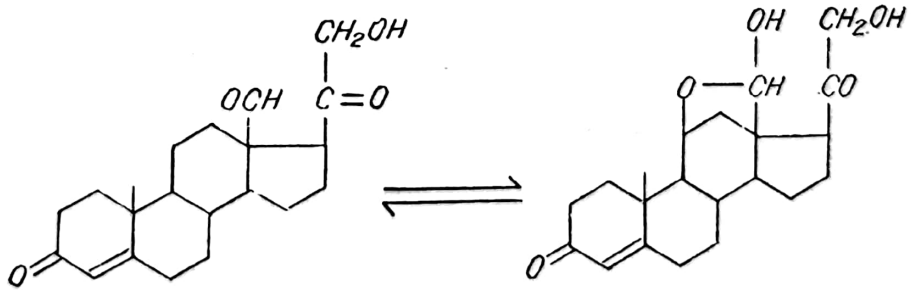
pregnan

Toţi corticoizii cuprind grupări cetonice la C_3 şi C_{20}, o legătură dublă la C_4 şi o grupare hidroxil la C_{21}. Ceea ce îi diferenţiază este prezenţa sau absenţa unor grupări oxigenate la C_{11} şi C_{17}. Cortisolul are formula:



Cortisolul
(hidrocortizonă)

Aldosterona este un steroid cu o însuşire particulară, cuprinde la C_{18} o grupare aldehidică în locul grupării $-CH_3$ prezentă la alţi compuşi. La aldosteronă între gruparea carbonil de la C_{18} şi cea alcoolică de la C_{11} este posibilă o semiacetalizare:



Aldosteronă

Biosinteză. Steroizii corticali sînt sintetizaţi pornindu-se de la colesterol. Acesta, la rîndul lui, provine din colesterolul plasmatic sau este obţinut ad-hoc din acetil-CoA. Biosinteza gluco- şi a mineralocorticoizilor trece prin acelaşi intermediar, pregnenolona, care rezultă din detaşarea oxidativă a unui fragment cuprinzînd atomii C_{22}—C_{27} din catena laterală a colesterolului. La nive-

Scanned with OKEN Scanner

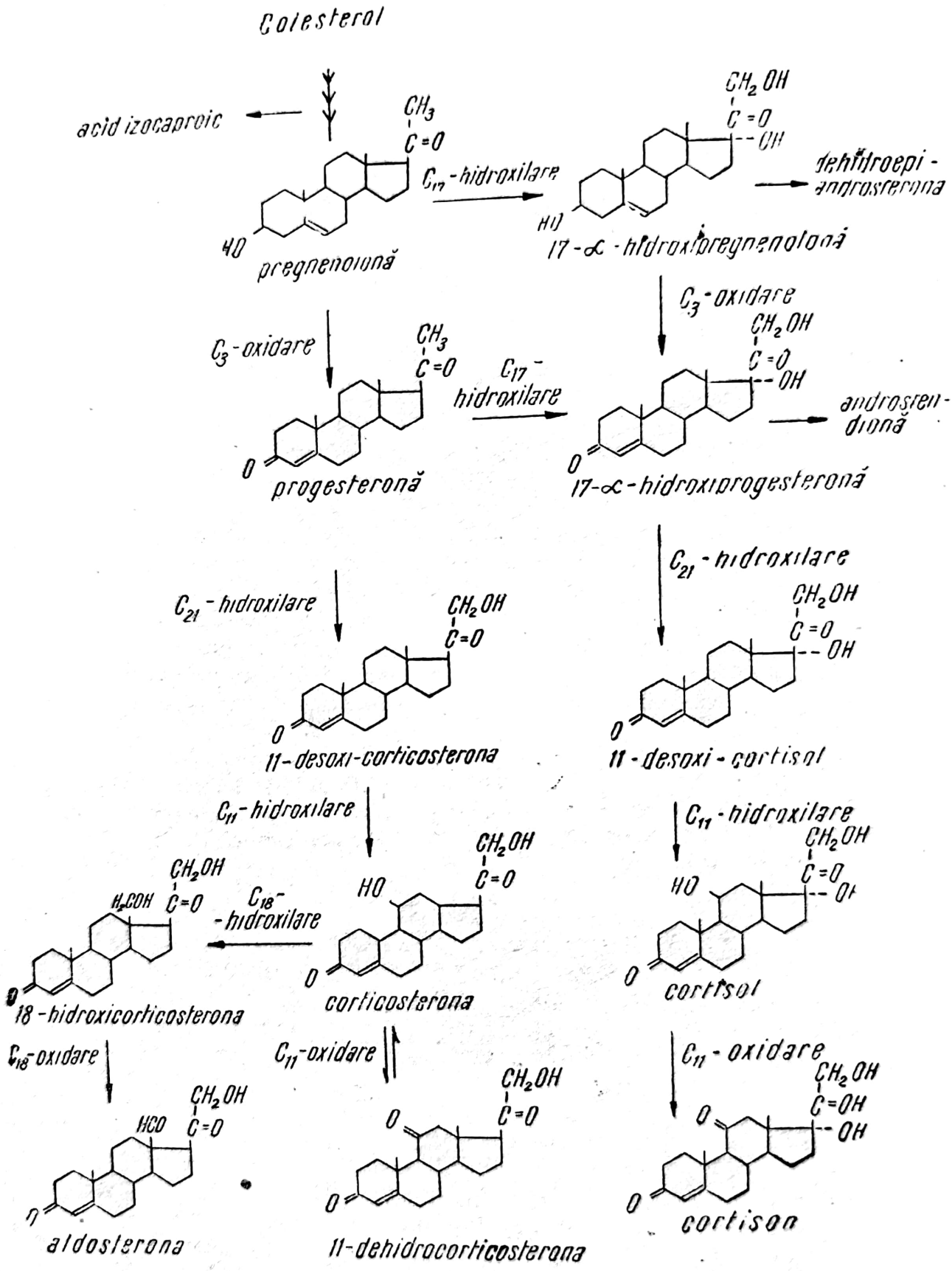


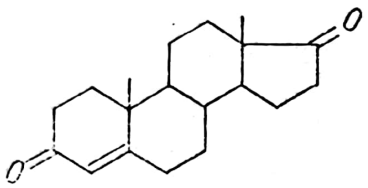
Fig. XIII.8. Biosinteza hormonilor corticosteroizi

Scanned with OKEN Scanner

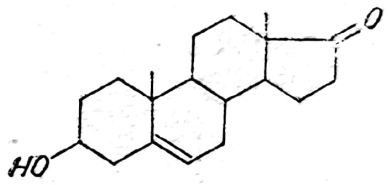
lul pregnenolonei secvența biosintetică se ramifică, o ramură duce la cortisol, alta la aldosteronă, în funcție de ordinea în care se fac hidroxilările la C_{17} și C_{21} (fig. XIII.8).

Elaborarea gluco- și mineralocorticoizilor are loc în regiuni distincte ale cortexului. Aldosterona este sintetizată în stratul extern (zona glomerulară) iar cortisolul în zona mijlocie (fasciculată). Componentul predominant în secreția corticală la om este cortisolul. La rozătoare corticosterona este cel mai abundent corticoid. Compușii intermediari care se formează în cursul secvențelor de biosinteză a cortisolului și aldosteronei posedă și ei, într-o măsură mai mare sau mai mică, proprietăți mineralo- sau glucocorticoide, dar secreția lor fiziologică este redusă.

În cortexul suprarenalei, în zona internă, o derivație biosintetică minoră duce la steroizi cu 19 atomi de carbon din grupul androgenilor. Principalii androgeni corticali sînt androstendiona și dehidroepiandrosterona:



Androstendionă



Dehidroepiandrosteronă

Secreția fiziologică de steroizi corticali cu activitate androgenică este mică. În diverse tulburări ale funcției corticale producția de androgeni poate fi exacerbată, determinînd sindromul adreno-genital.

Transport. Cortisolul circulă în plasmă în mare majoritate (95—97%) legat de o proteină din fracțiunea α-globulinelor denumită transcortină. Aldosterona este foarte slab legată de proteine. Formele active biologic, care sînt fixate de receptorii celulari, sînt steroizii liberi.

Catabolism. Viața biologică a hormonilor corticali circulanți este de 1,5—3 ore. Acești hormoni sînt inactivați în principal în ficat, prin hidrogenarea nucleului A, a grupării 20-ceto și eventual, prin detașarea catenei laterale din C_{17} se formează 17-cetosteroizi. În fig. XIII.9 se arată catabolismul cortisolului. Metaboliții cu grupare hidroxil la C_3 sînt excretați prin urină ca sulfo- sau glucurono-conjugați.

Activitatea biologică a glucocorticoizilor se exercită primar asupra metabolismului proteinelor endogene dar secundar sînt afectate metabolismul glucidelor (de aici denumirea de glucocorticoizi) și al lipidelor. Acești hormoni intensifică catabolismul proteinelor tisulare, degradarea lor la aminoacizi. Proteinele din mușchii scheletici și cele din ficat sînt cele mai labile, răspund cel mai intens la stimularea glucocorticoidă. Prin dislocarea proteinelor se eliberează aminoacizi (crește aminoacidemia) care sînt captați în majoritate de ficat unde sînt dezaminați (crește excreția urinară de azot, de uree) iar catenele lor hidrocarbonate sînt convertite în glucoză. Intensificarea gluconeogenezei este efectul cel mai pregnant al glucocorticoizilor. Glucoza neoformată duce la hiperglicemie, la glicogenogeneză hepatică și musculară, la intensificarea utilizării glucozei drept combustibil în ficat. Cortisolul, fără să

Scanned with OKEN Scanner

influenţeze secreţia de insulină, diminuează utilizarea glucozei de către ţesuturile insulino-dependente prin scăderea sensibilităţii acestora faţă de insulină.

La nivelul ţesutului adipos glucocorticoizii intensifică lipoliza. Se pare că acest răspuns metabolic este rezultatul facilitării acţiunii lipolitice a catecolaminelor (acţiune permisivă).

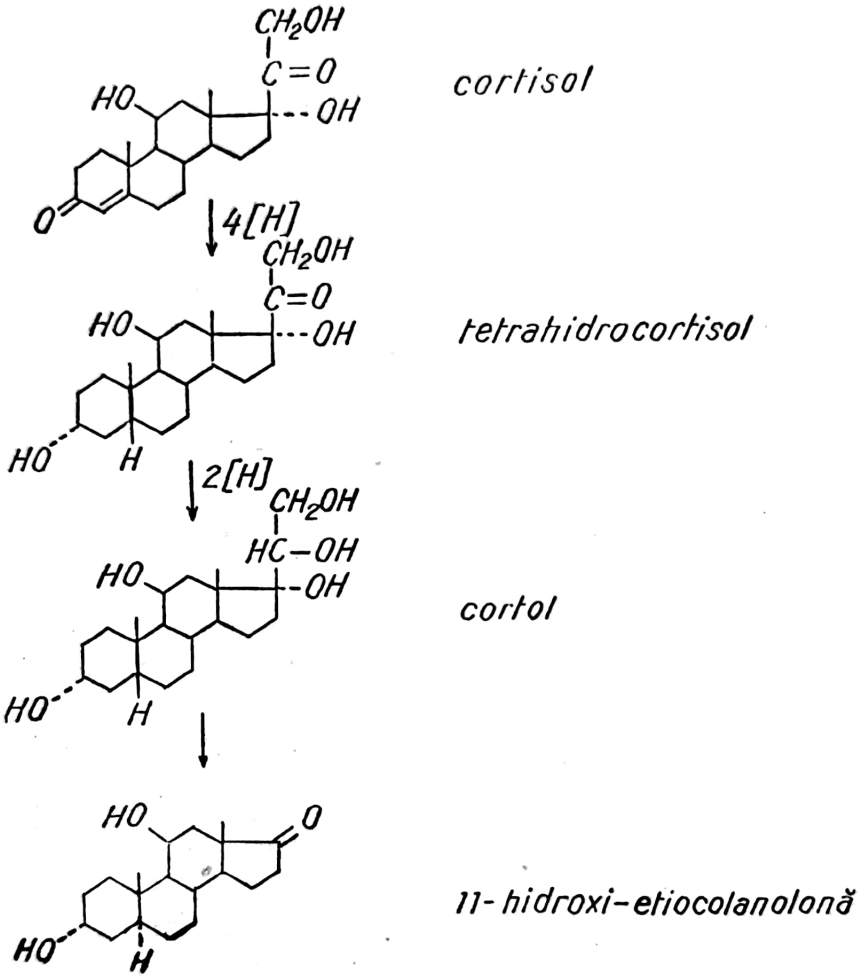


Fig. XIII.9. Catabolismul cortisolului.

În afara efectelor metabolice, cortisolul mai exercită şi alte acţiuni ce nu pot fi explicate pe aceeaşi bază biochimică, glucocorticoidă; are acţiune antiinflamatoare, de împiedicare a răspunsului inflamator după diverse injurii infecţioase, traumatice, toxice şi acţiune imunosupresivă, de diminuare a sintezei de anticorpi. Prin sinteză au fost obţinuţi steroizi mai activi decît substanţele naturale şi cu acţiuni antiinflamatoare sau imunosupresive mai specifice, care au o întrebuinţare largă în terapeutică.

Controlul secreţiei de glucocorticoizi. Efectele metabolice ale glucocorticoizilor sînt coordonate în scopul adaptării organismului la efectuarea unor travalii prelungite pe seama rezervelor energetice endogene. Cerinţa principală este asigurarea organismului cu glucoză, combustibilul exclusiv al creierului şi al hematiilor. Prin intermediul glucocorticoizilor organismul apelează la proteinele tisulare pentru a obţine substrate gluconeogenetice.

Funcţia glucocorticoidă a adrenalelor este controlată prin sistemul hipotalamo-hipofizar. Hormonul adenohipofizar, corticotropina (ACTH), re-

glează toate etapele elaborării și secreției de glucocorticoizi: dezvoltarea trofică a glandei (a zonei mijlocii și interne), biosinteza și eliberarea hormonilor. Secreția de ACTH de către hipofiză este controlată la rîndul ei de hipotalamus prin factorul de eliberare specific. Hipotalamusul este sensibil la variațiile cortisolemiei, secreția factorului de eliberare a corticotropinei, este inhibată de concentrațiile plasmatice ridicate de cortisol. Cortisolemia scăzută și stimularea nervoasă sub acțiunea a diverși factori stresanți (emoții, arsuri, frig, hipertermie, hipotensiune) determină secreția factorului de eliberare hipotalamic care ajunge prin sistemul port la adenohipofiză, aceasta răspunzînd prin secreție de corticotropină. Corticotropina stimulează activitatea steroidogenă a adrenalelor și secreția de cortisol. Efectele metabolice declanșate de cortisol furnizează organismului mijloacele de a răspunde la agresiuni interne și externe. Acest răspuns este mai lent decît cel indus de catecolamine, dar are o durată mai lungă și cu ecouri mai adînci în metabolism. Nivelul plasmatic al cortisolului suferă un ritm circadian, în funcție de alternanța perioadelor de somn și de veghe. Nivelul maxim al cortisolemiei este atins dimineața după somn (ora 8) iar minimul este situat spre seară. Nu se cunoaște mecanismul acestor fluctuații ritmice.

Activitatea biologică a aldosteronei. Mineralocorticoizii reglează homeostazia hidrică și electrolitică. Acțiunea primară a aldosteronei constă în resorbția ionilor Na^+ în tubii renali distali. Transportul transtubular de sodiu este cuplat cu migrarea în sens invers a ionilor K^+ și H^+ (pentru păstrarea electroneutralității) ceea ce determină o acidificare ușoară a urinei și creșterea kaliuriei. Pe de altă parte, resorbția ionilor de sodiu antrenează retenția osmotică de apă. În acest fel, aldosterona prin controlul natremiei contribuie la reglarea volumului fluidului extracelular, la menținerea presiunii arteriale.

Controlul secreției de aldosteronă. Sinteza de aldosteronă este localizată în zona externă a cortexului și ea nu este controlată prin ACTH. Producția și secreția de aldosteronă urmează fluctuațiile fluidului extracelular și la acest mecanism homeostatic participă sistemul renină-angiotensină. Acest sistem complex este alcătuit dintr-o enzimă renală (renina) și peptidele plasmatice angiotensinogen, angiotensină I, angiotensină II și alți factori insuficient caracterizați. Renina este o enzimă proteolitică (gr. mol. 43 000) elaborată de celulele juxtaglomerulare din rinichi și este eliberată în circulație cînd scade presiunea arterială și/sau debitul sanguin din rinichi. În plasmă renina acționează asupra unei proteine din grupul α_2-globulinelor — angiotensinogen — din care se detașează un decapeptid, angiotensina I (asp-arg-val-tir-ileu-his-phe-his-leu). Angiotensina I, sub acțiunea unor factori de conversie care detașează doi aminoacizi terminali, este transformată în octapeptidul angiotensină II, substanță fiziologic activă. Angiotensina II stimulează secreția de aldosteronă care prin retenție de sodiu determină creșterea volumului și a presiunii sîngelui. Creșterea debitului și a presiunii arteriale renale inhibă secreția de renină și ciclul renină-angiotensină este întrerupt. Timpul de înjumătățire a angiotensinei II este foarte scurt, substanța este inactivată rapid prin hidroliză, sub acțiunea unor peptidaze plasmatice, angiotensinaze. În fig. XIII.10 se ilustrează funcționarea sistemului de control al secreției de aldosteronă.

Patologia corticosuprarenalei. Cortexul suprarenalei este esențial pentru viață. Deficiența acută de corticosteroizi determină hipoglicemie, pierderi masive de sare, deshidratare și colaps.

Scanned with OKEN Scanner

Insuficienţa cronică de corticosteroizi datorată unei distrugeri progresive a suprarenalelor (boala Addison) este caracterizată prin diminuarea turnoverului aminoacizilor, hipoglicemie, dereglări ale echilibrului hidro-salin, hiperpigmentarea tegumentelor (datorită acţiunii melanotrope exercitată de ACTH).

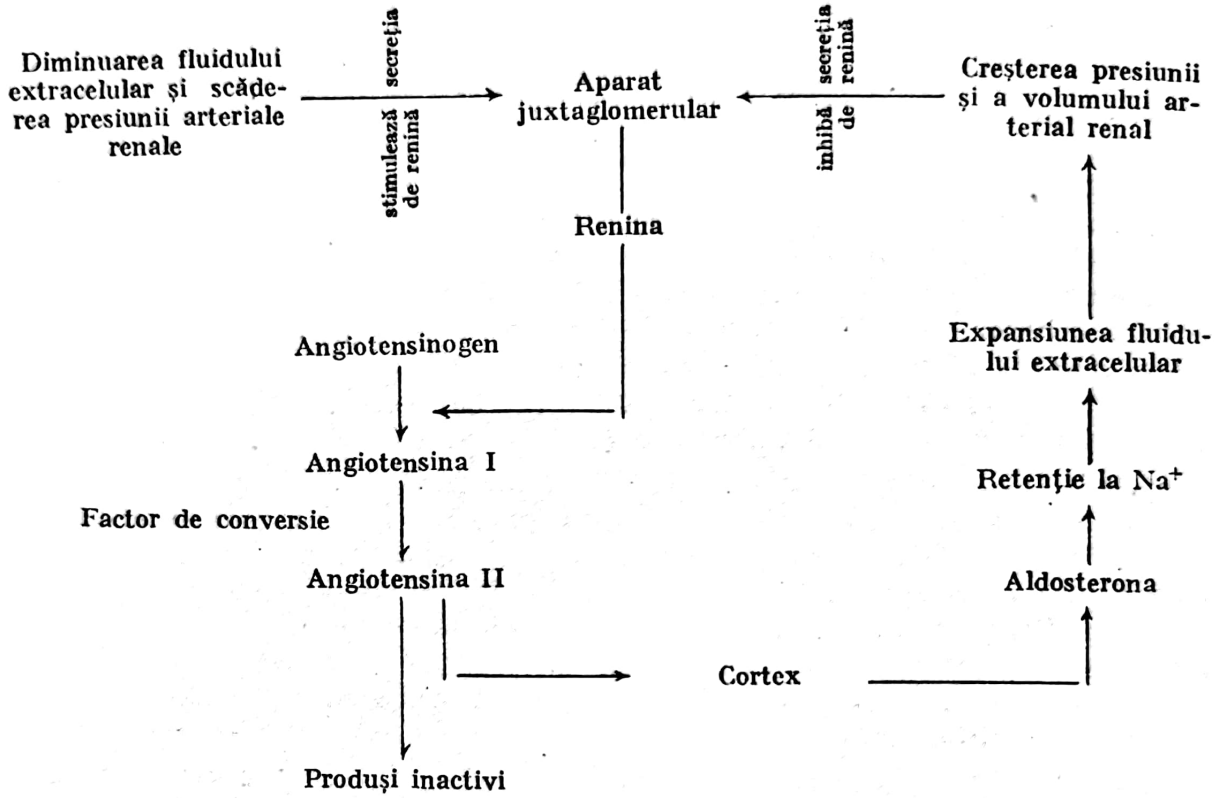


Fig. XIII.10. Controlul secreţiei de aldosteronă.

Hipercorticismul după natura defectului metabolic sau a zonei corticale afectate se manifestă printr-o secreţie crescută de glucocorticoizi, de mineralocorticoizi sau de androgeni. Hipercortisolemia este datorată fie unei tumori suprarenale, fie unei suprasolicitări adrenocorticotrope a corticalei (sindrom sau boala Cushing). Boala este caracterizată prin catabolism proteic excesiv, hiperglicemie (diabet zaharat steroid, tulburări de metabolism lipidic). Asocierea hipercortisolemiei cu hipersecreţie de aldosteronă completează tabloul clinic cu retenţie de sare, de apă, hipertensiune arterială.

Hiperproducţia de steroizi androgeni corticosuprarenali se manifestă la copii prin „virilizare" prematură (pseudopubertate), iar la femeia adultă prin masculinizare (hirsutism, acnee, alopecie, hipertrofia musculaturii).

Hiperaldosteronismul (sindromul Conn) datorat unei tumori a zonei glomerulare a cortexului se manifestă în special prin dereglarea metabolismului potasiului (hipokalemie, hiperkaliurie), retenţia de sodiu şi de apă fiind relativ reduse.

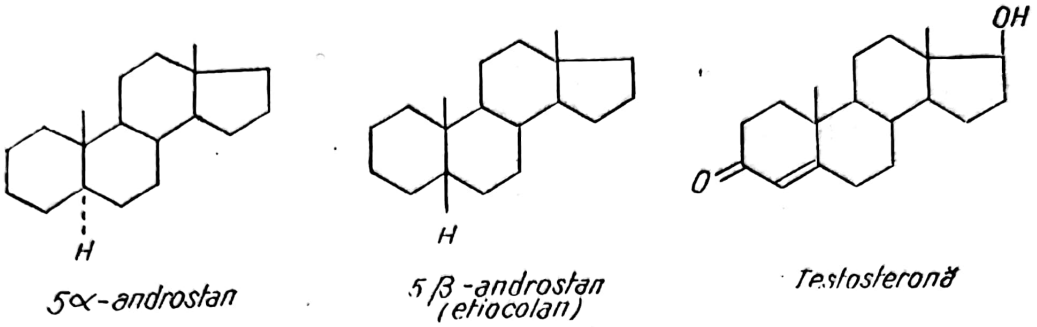
7. HORMONII SEXUALI

Hormonii sexuali au o structură steroidică. Hormonii masculini (androgenii) sînt steroizi cu 19 atomi de carbon, estrogenii au 18 atomi de carbon iar progestinele (gestagenii) sînt steroizi C_{21}.

Scanned with OKEN Scanner

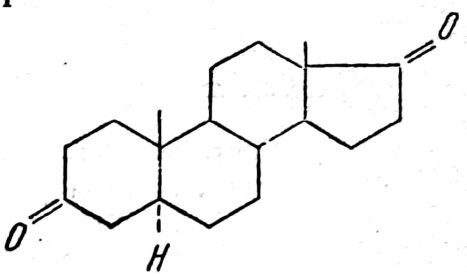
7.1. ANDROGENII

Chimie. Androgenii derivă din hidrocarburile 5α-androstan și 5β-androstan (etiocolan):



5α-androstan — 5β-androstan (etiocolan) — Testosteronă

O serie de alți steroizi exercită acțiuni androgenice, mai slabe sau mai puternice, dar principalul androgen de origine testiculară este testosterona. La nivelul țesuturilor țintă (veziculă seminală, prostată), testosterona este transformată sub acțiunea unei 5α-steroid-reductaze (NADPH-dependentă) în dihidro-testosteronă, forma biologic activă la nivel celular care interacționează cu receptorii citoplasmatici.



dihidrotestosteronă

Biosinteză. Testosterona este sintetizată în celulele interstițiale testiculare (celulele Leydig) printr-o secvență similară în etapele incipiente cu cea de sinteză a corticosteroizilor. Derivatul C_{17}-hidroxilat al pregnenolonei și cel al progesteronei, prin detașarea catenei laterale, dau steroizi C_{19}, precursori ai testosteronei (fig. XIII.11).

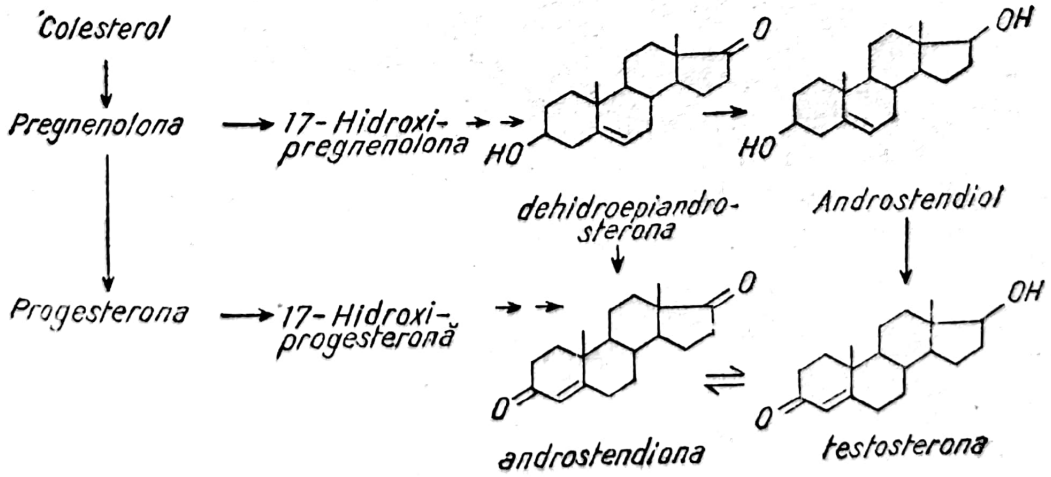
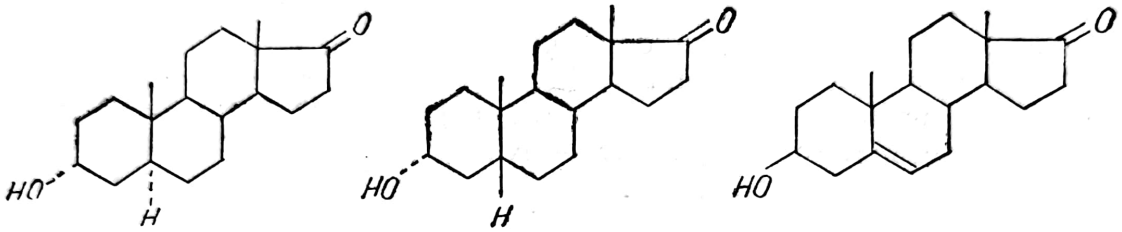


Fig. XIII.11. Biosinteza hormonilor androgeni.

Dehidroepiandrosterona şi androstendiona sînt sintetizate şi de adrenale iar substanţele circulante pot fi captate de testicul şi transformate în testosteronă. Aceasta reprezintă o cale auxiliară de sinteză a testosteronei.

Transport şi catabolism. Testosterona şi ceilalţi androgeni circulă în sînge legaţi de proteine specifice (sex-steroid binding proteins).

Androgenii testiculari sau adrenalieni sînt catabolizaţi prin hidrogenarea nucleului A; compuşii 17-hidroxilaţi suferă în plus o dehidrogenare a acestei grupări. Cataboliţii androgenilor cuprinzînd o grupare cetonică la C_{17} sînt cunoscuţi drept 17-cetosteroizi neutri (estrogenii sînt şi ei 17-cetosteroizi dar au caracter acid). Sînt eliminaţi prin urină ca sulfo- sau glucurono-conjugaţi (conjugarea făcîndu-se la gruparea hidroxilică C_3). Principalii 17-cetosteroizi (neutri) urinari sînt androsterona, etiocolanolona şi dehidroepiandrosterona:



Androsteronă *Etiocolanolonă* *Dehidroepiandrosteronă*

Steroizii corticali, gluco- şi mineralocorticoizi, sînt şi ei catabolizaţi parţial la 17-cetosteroizi. Concentraţia sanguină a 17-cetosteroizilor neutri şi nivelul eliminării urinare reflectă activitatea corticală şi testiculară. Determinarea lor în urină, mai ales la femei la care nu se adaugă androgenii gonadelor, este o probă de explorare a funcţiei corticale.

Activitate biologică. Androgenii sînt răspunzători de dezvoltarea şi funcţionarea glandelor sexuale anexe, de apariţia şi menţinerea caracterelor sexuale secundare. Androgenii stimulează sinteza proteică, efecte ce se manifestă foarte pregnant la pubertate prin dezvoltarea oaselor, a musculaturii scheletice.

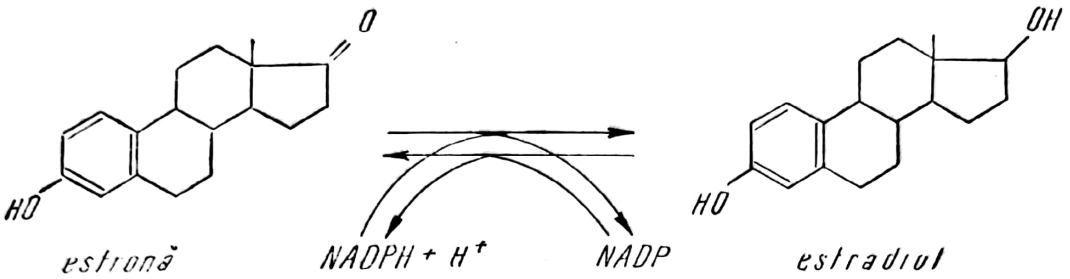
Controlul secreţiei. Dezvoltarea şi funcţia secretorie a organelor sexuale masculine sînt controlate prin feed-back negativ de gonadotropinele hipofizare şi de factorii hipotalamici. FSH-ul (hormonul stimulator al foliculului) controlează dezvoltarea glandelor sexuale anexe şi spermatogeneza. LH-ul (hormonul luteinizant) denumit şi ICSH după acţiunea sa stimulatoare asupra celulelor interstiţiale controlează biosinteza şi secreţia de androgeni. Hipotalamusul secretă factorul de eliberare LH/FSH-RF care controlează la rîndul lui secreţia de gonadotropine. Androgenii circulanţi inhibă atît secreţia de gonadotropine, cît şi pe cea a factorului de eliberare hipotalamic.

7.2. ESTROGENII

Sînt hormoni elaboraţi de ovar, de foliculul lui Graaf în curs de maturare iar după ovulaţie, de corpul galben. La femeia gestantă placenta secretă cantităţi importante de estrogeni.

Scanned with OKEN Scanner

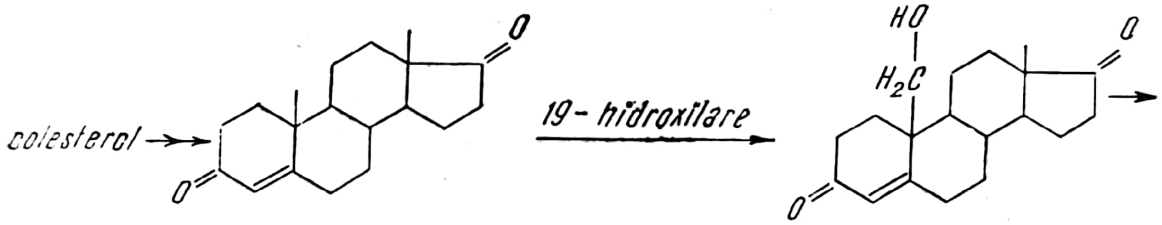
Chimie. Sînt steroizi C_{18} și se deosebesc de toți ceilalți steroizi prin prezența unui nucleu aromatic (nucleul A) și a unei grupări fenolice (fenol-steroizi, steroizi-acizi). Substanțele cu acțiune hormonală sînt estrona și estradiolul care sînt interconvertibile printr-o reacție de hidrogenare-dehidrogenare:



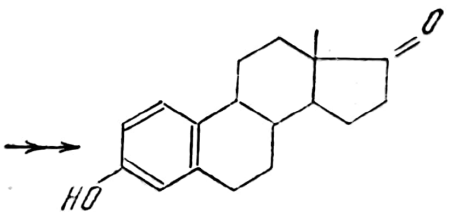
estronă — estradiol

Substanța activă intracelular este însă numai estradiolul.

Biosinteză. Reacția specifică în secvența biosintetică, care conduce la estrogeni, este hidroxilarea C_{19} din androstendionă după care urmează pierderea acestui atom și aromatizarea nucleului A (reacții puțin cunoscute):

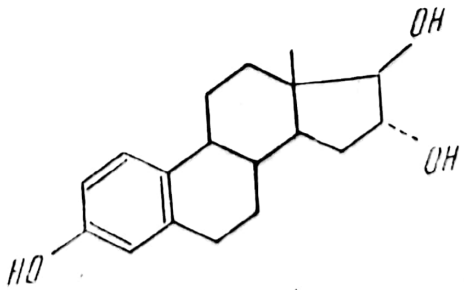


androstendionă — 19-hidroxi-androstendionă



estronă

Transport și catabolism. Estrogenii sînt vehiculați prin plasmă de aceleași proteine care transportă androgenii (sex-steroid binding proteins). Estrogenii, estrona și estradiolul, sînt eliminați în bună parte ca atare, după conjugare hepatică cu acidul sulfuric și cu acidul glucuronic. O modificare catabolică pe care o suferă estrogenii este hidroxilarea la C_{16} cu formarea estriolului:



estriol

O parte din estrogeni sînt eliminaţi pe cale biliară şi în intestin conjugaţii sînt hidrolizaţi şi reabsorbiţi parţial, realizîndu-se un circuit entero-hepatic.

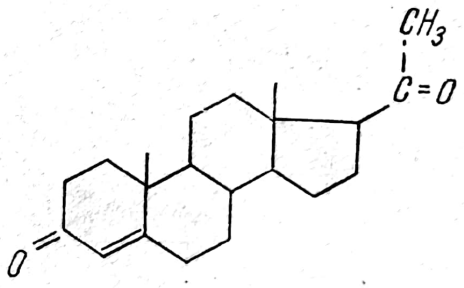
Activitate biologică. Estrogenii sînt răspunzători de dezvoltarea organelor sexuale anexe, de apariţia şi menţinerea caracterelor sexuale secundare feminine. Ei controlează desfăşurarea ciclului ovarian.

Control. Secreţia de estrogeni este reglată de cele două gonadotropine hipofizare.

FSH-ul stimulează dezvoltarea foliculului, iar LH-ul induce ovulaţia şi stimulează secreţia de estrogeni. La rîndul lui factorul de eliberare hipotalamic reglează secreţia de gonadotropine.

7.3. PROGESTINELE

Principalul hormon progestaţional este progesterona:

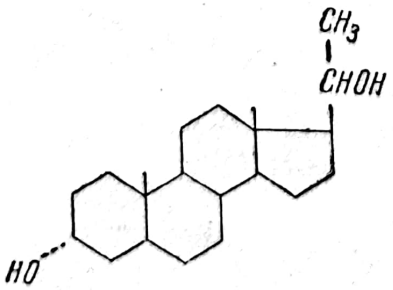


progesterona

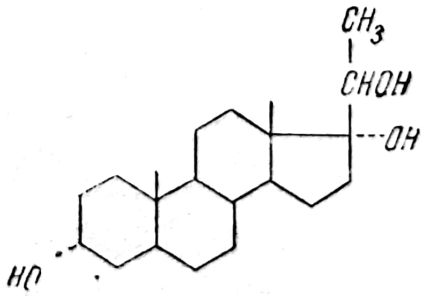
Acest steroid este intermediar în sinteza tuturor hormonilor steroidici. Totuşi, numai substanţa elaborată de ovar (şi după fecundaţie de placentă) este secretată în cantitate suficientă pentru a exercita acţiune hormonală.

Progesterona este secretată de corpul galben şi controlează faza luteală a ciclului ovarian. Dacă oul este fertilizat progesterona pregăteşte uterul în vederea nidării şi dezvoltării oului. După dezvoltarea placentei, progesterona este produsă de acest organ.

În sînge, progesterona este vehiculată de proteine plasmatice. Este inactivată în ficat prin hidrogenare şi hidroxilare la C_{17}. Principalii cataboliţi ai progesteronei sînt pregnandiolul şi pregnantriolul:



pregnandiol

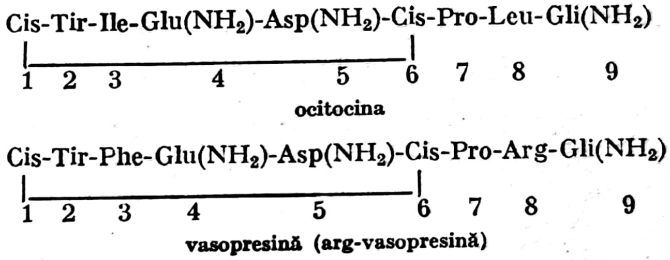


pregnantriol

8. HORMONII NEUROHIPOFIZARI

Lobul posterior al hipofizei este de origine nervoasă şi împreună cu nucleii hipotalamici (supraoptic şi paraventricular) şi tractul neuro-hipofizar alcătuiesc o unitate funcţională, neurohipofiza. Acest sistem elaborează doi hormoni, vasopresina (hormonul antidiuretic, antidiuretină, pitresină) şi ocitocină (pitocină). Acest substanţe sînt elaborate de hipotalamus (vasopresina este formată mai ales în nucleul supraoptic iar ocitocina în cel paraventricular) şi depozitate în lobul posterior al hipofizei în asociere cu proteine (neurofizine). Secreţia acestor hormoni are loc independent sub acţiunea unor stimuli specifici.

Ocitocina şi hormonul antidiuretic au structuri chimice asemănătoare, sînt ambele nonapeptide care diferă numai prin două resturi de aminoacizi. Hormonii umani sînt identici cu cei ai multor verterbrate. Numai vasopresina de porc diferă de cea a altor specii prin înlocuirea restului de arginină (arginino-vasopresină) cu un rest de lizină (lizino-vasopresină):



Activitate biologică. Hormonul antidiuretic (vasopresină, ADH, antidiuretină) participă la homeostazia volumului şi a osmolarităţii lichidelor din organism, prin reglarea eliminării renale de apă. Ţesuturile ţintă sînt tubii renali (tubul contort distal şi canalul colector) la nivelul cărora vasopresina creşte permeabilitatea pentru apă determinînd conservarea apei şi eliminarea unei urini hiperosmotice.

Secreţia de hormon antidiuretic este controlată de concentraţia osmotică a fluidului extracelular. Se presupune existenţa unor osmoreceptori hipotalamici sensibili la modificări foarte mici ale presiunii osmotice. O pierdere de apă care concentrează osmotic fluidul extracelular declanşează secreţia de vasopresină, care prin retenţie de apă la nivelul rinichiului, diminuează presiunea osmotică a lichidelor extracelulare. Hemodiluţia consecutivă acţiunii hormonului antidiuretic inhibă la rîndul ei eliberarea hormonului. Vasopresina circulantă are o viaţă biologică foarte scurtă, timpul de înjumătăţire este de 1—5 minute.

Lezarea sistemului supraoptic (traumatisme craniene, tumori, infecţii) şi scăderea secreţiei de vasopresină determină diabetul insipid, caracterizat prin eliminare de volume mari de urină (ajungîndu-se pînă la 20—25 l/24 h), prin pierderea capacităţii resorbtive a tubilor renali pentru apă.

Ocitocina stimulează contracţia musculaturii netede a uterului şi a celulelor mioepiteliale din glanda mamară, participînd prin aceste efecte la expulzarea fătului şi la ejecţia laptelui. Receptivitatea uterului faţă de ocitocină la femeile gestante devine maximă imediat înaintea naşterii.

Scanned with OKEN Scanner

9. HORMONII ADENOHIPOFIZARI ŞI HIPOTALAMICI

Lobul anterior al hipofizei şi cel intermediar sînt de origine glandulară şi alcătuiesc împreună adenohipofiza. Dimensiunile lobului median sînt reduse şi prezintă variaţii importante de la o specie la alta. Această porţiune este foarte puţin dezvoltată la om.

Adenohipofiza secretă 7 hormoni (tabelul XIII.1). Unii dintre aceştia exercită acţiuni metabolice generale, cum este de pildă hormonul de creştere, pe cînd alţii controlează activitatea altor glande endocrine, dezvoltarea lor trofică, activitatea sintetică sau funcţia lor secretorie. Hormonii adenohipofizari sînt denumiţi hormoni tropi, tropine sau stimuline.

Adenohipofiza ocupă o poziţie de o deosebită însemnătate în sistemul endocrin. Ea reglează activitatea diverselor glande endocrine, dar la rîndul ei este supusă unui control riguros atît nervos cît şi umoral. Adenohipofiza,

Tabelul XIII.1

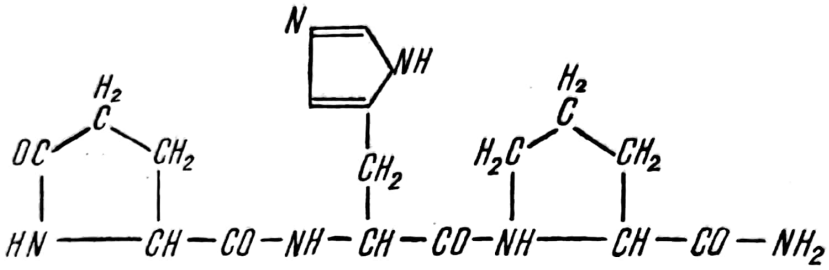
Hormonii adenohipofizari

Nr. crt.	Hormonul	Ţesutul ţintă	Funcţiile principale
1	Hormonul de creştere (somatotropină; GH=growth hormone).	Diverse	Sinteza de proteine
2	Adrenocorticotropină (corticotropină; ACTH=adrenocorticotropic hormone).	Cortexul suprarenalei	Sinteza şi secreţia de hormoni corticali
3	Tireotropină (hormonul tireotrop; TSH=thyroid-stimulating hormone).	Tiroida	Sinteza şi secreţia de tiroxină
4	Prolactină (hormonul lactogen).	Glanda mamară	Producţia de lapte
5	Hormonul foliculo-stimulant (FSH = follicule-stimulating hormone).	La femei foliculul; la bărbaţi testiculul	Maturarea foliculului; spermatogeneza
6	Hormonul luteinizant (LH = luteinizing hormone, hormonul stimulator al celulelor interstiţiale, ICSH=interstitial cell-stimulating hormone).	La femei foliculul; la bărbaţi testiculul	Ovulaţia, formarea corpului galben, secreţia de progesteronă şi de esterogeni; sinteza şi secreţia de testosteronă
7	Melanotropină (hormonul melanocitostimulator, MSH=melanocyte-stimulating hormone).	Melanocitele	Pigmentare

spre deosebire de lobul posterior hipofizar, are puţine conexiuni nervoase cu hipotalamusul la baza căruia este situată. Legătura dintre aceste două structuri se face printr-un sistem vascular port, descoperit în 1930 de Grigore Popa şi V. Fielding. Sistemul port de vase capilare între eminenţa mediană şi hipofiză constituie baza anatomică a sistemului de control neuro-endocrin al secreţiei hormonilor hipofizari. Terminaţiile fibrelor nervoase hipotalamice eliberează substanţe active în capilarele eminenţei mediane, acestea sînt transportate prin vasele portale la hipofiză unde stimulează sau inhibă eliberarea tropinelor hipofizare (Schally — 1945). Pînă în prezent a fost recunoscută existenţa a nouă substanţe hipotalamice reglatoare, denumite factori

Scanned with OKEN Scanner

sau hormoni de eliberare, RF sau RH (releasing factors sau releasing hormones) şi respectiv, factori sau hormoni inhibitori ai eliberării tropinelor hipofizare RIF sau RIH (release inhibiting factors sau release inhibiting hormones) (tabelul XIII.2). Primul hormon hipotalamic izolat şi caracterizat din punct de vedere chimic a fost factorul de eliberare a tireotropinei (Schally — 1966). Este un tripeptid: piroglutamil-histidil-prolinamidă:

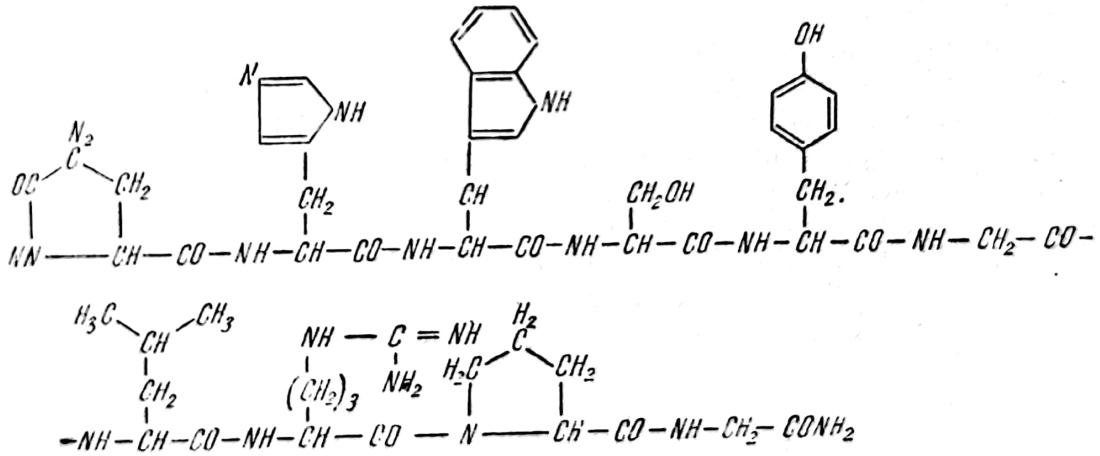


Restul glutamil din poziţia N-terminală este ciclizat prin eliminare de apă între gruparea $-NH_2$ şi gruparea γ-COOH. Restul C-terminal are gruparea carboxilică amidată.

Structura factorului de eliberare a tireotropinei a fost confirmată prin sinteză. Hormonul sintetic este utilizat în diagnosticul afecţiunilor tiroidiene şi la evaluarea funcţiei hipofizare. Se întrevede posibilitatea utilizării sale clinice.

Au mai fost izolaţi şi identificaţi chimic alţi trei factori hipotalamici.

Factorul de eliberare a hormonului luteinizant, LH-RF. Este un decapeptid: piroglutamil-histidil-triptofanil-seril-tirozil-glicil-leucil-arginil-prolil-glicinamidă



Decapeptidul, natural sau sintetic, exercită şi acţiunea de eliberare a hormonului foliculo-stimulant (FSH), fapt ce confirmă presupunerea că un singur factor hipotalamic controlează eliberarea celor două gonadotropine hipofizare (LH/FSH—RF).

Factorul inhibitor al eliberării hormonului de creştere (GH-RIF sau somatostatina) este de asemenea un oligopeptid, cuprinde 14 resturi aminoacidice:

H-Ala-Gli-Cis-Lis-Asp(NH_2)-Fe-Fe-Trp-Lis-Tre-Fe-Tir-Ser-Cis-OH

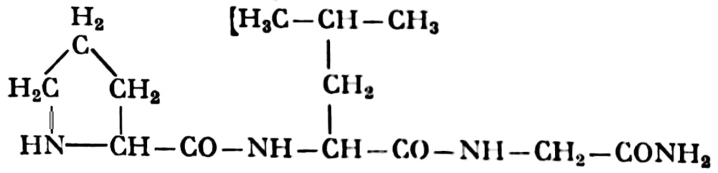
Scanned with OKEN Scanner

Tabelul XIII.2

Factorii hipotalamici de reglare a adenohipofizei

Factorul hipotalamic	Prescurtare	Hormonul adenohipofizar supus controlului
Factori de eliberare (releasing factors)		
Factorul de eliberare a corticotropinei	C—RF	ACTH
Factorul de eliberare a tireotropinei	TSH—RF	TSH
Factorul de eliberare a hormonului luteinizant	LH/FSH—RF	LH, FSH
Factorul de eliberare a hormonului de creştere	GH—RF	Somatotropina
Factorul de eliberare a prolactinei	P—RF	Prolactina
Factorul de eliberare a hormonului melano-cito-stimulator	MSH—RF	MSH
Factori inhibitori ai eliberării (release inhibiting factors)		
Factorul inhibitor al eliberării hormonului de creştere (somatostatină)	GH—RIF	Somatotropina
Factorul inhibitor al eliberării prolactinei	P—RIF	Prolactină
Factorul inhibitor al eliberării hormonului melanocito-stimulator	MSH—RIF	MSH

Factorul inhibitor al eliberării de melanotropină (MSH-RF) este un tripeptid, prolil-leucil-glicinamidă:



Este de subliniat că acest tripeptid cuprinde secvenţa terminală a ocitocinei.

Ceilalţi hormoni hipotalamici sînt de asemenea peptide mici.

Hipotalamusul şi hipofiza sînt supuşi unui retrocontrol negativ prin concentraţia hormonilor periferici circulanţi. În fig. XIII.12 se arată schematic mecanismul de reglare hipotalamo-hipofizară a sistemului endocrin. Scăderea concentraţiei plasmatice a hormonului periferic, în conjuncţie cu diverşi stimuli nervoşi, constituie semnalul pentru secreţia unui factor hipotalamic de eliberare (RF). Acesta ajunge prin sistemul port hipofizar la adenohipofiză unde declanşează eliberarea unei tropine specifice. Hormonul hipofizar determină la nivelul glandei endocrine ţintă modificări trofice şi secretorii care se concretizează prin punerea în circulaţie a hormonului. Acesta din urmă inhibă secreţia hipofizară de tropină, iar la nivelul hipotalamusului inhibă secreţia factorilor de eliberare şi/sau stimulează secreţia factorilor inhibitori. În afara acestei relaţii de feed-back între hormonul periferic şi hipofiză plus hipotalamus, mai poate să funcţioneze şi un control direct între tropina hipofizară şi hipotalamus, tropina inhibînd secreţia factorilor de eliberare.

Acest sistem complex de control nu funcţionează la fel pentru toate glandele endocrine. Pentru corticotropină şi cele două gonadotropine nu s-au identificat hormoni hipotalamici de inhibiţie. Aceasta se poate explica prin faptul că hormonii glandelor ţintă, cortisolul, hormonii tiroidieni, hormonii sexuali, inhibă ei singuri secreţia tropinelor hipofizare ca şi a factorilor de eliberare hipotalamici. În cazul hormonului de creştere, al prolactinei şi al

Scanned with OKEN Scanner

hormonului melanostimulinei existența factorilor hipotalamici de stimulare și de inhibiție a eliberării este justificată de absența unei conexiuni feed-back între hormonii hipofizari și sistemul hipotalamo-hipofizar.

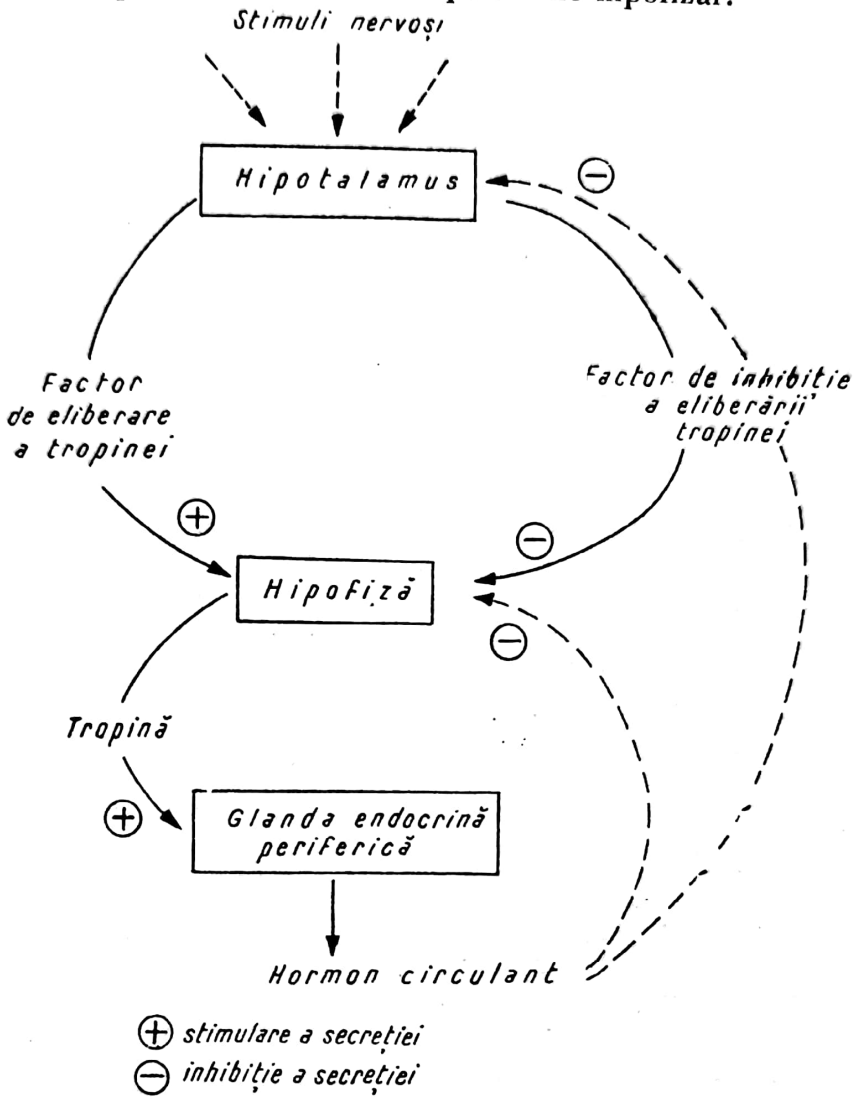


Fig. XIII.12. Schema generală de reglare hipotalamo-hipofizară a glandelor endocrine periferice.

9.1. HORMONUL DE CREȘTERE (SOMATOTROPINA)

STH = somatotropic hormone
GH = growth hormone
HGH = human growth hormone

Hormonul uman este un polipeptid cuprinzînd 191 resturi de aminoacizi. Hormonii izolați de la alte specii au structuri mai mult sau mai puțin diferite de hormonul uman. Spre deosebire de alți hormoni care nu prezintă specificitate de specie în ceea ce privește activitatea lor biologică, hormonul de creștere este activ numai la specia de unde a fost izolat sau la specii înrudite.

Hormonul de creștere este indispensabil în tot cursul vieții, participînd la reglarea unor procese metabolice fundamentale. Acțiunea sa primară pare

Scanned with OKEN Scanner

a fi stimularea sintezei de proteine în toate țesuturile determinînd creșterea greutății corporale. Acest efect este rezultatul creșterii vitezei de captare a aminoacizilor din sînge. Accelerarea ritmului de sinteză a proteinelor solicită metabolismul întregului organism pentru furnizarea de material plastic și de substrate energetice, sinteza proteinelor necesitînd un aport considerabil de energie. Aceasta face ca hormonul de creștere să declanșeze răspunsuri metabolice dintre cele mai variate:

a) Pozitivează bilanțul azotat prin retenție de azot (încorporat în proteine) și diminuarea excreției de uree (catabolismul aminoacizilor este încetinit).

b) Retenție de ioni fosforici și Ca^{2+} prin depozitarea lor în matricea proteică osoasă (efect foarte puternic la organismele în creștere).

c) Stimulează sinteza de mucopolizaharide în toate țesuturile conjunctive, probabil consecutiv sintezei crescute de colagene.

d) Mobilizează grăsimile din țesutul adipos amplificînd efluxul de acizi grași în scopul de a furniza organismului material energogen. Accelerează arderea acizilor grași liberi de către mușchi.

e) Crește glicemia prin scăderea răspunsului la insulină a țesuturilor insulino-sensibile, este favorizată conversia glucozei în aminoacizi.

Concentrația plasmatică a hormonului de creștere variază cu vîrsta, este mai mică la sugar și copil pînă la aproximativ patru ani cînd atinge nivelul mediu al adultului. În cursul unei zile cantitatea de hormon circulant fluctuează fiind afectată de diverși stimuli, de agresiuni diverse, de eforturi fizice. Concentrația aminoacizilor în sînge este un parametru care controlează secreția hormonului de creștere. Aminoacidemia crescută după ingerarea de proteine declanșează prompt secreția de somatotropină. Secreția hipofizară a hormonului de creștere este controlată de hipotalamus printr-un factor de eliberare (GH—RF) și un factor inhibitor al eliberării (GH—RIF sau somatostatină).

Insuficiența hipofizară în copilărie, cu afectarea preponderentă a celulelor ce secretă somatropină, determină încetinirea creșterii — nanism hipofizar. La adult hipofuncția adenohipofizară globală (panhipopituitarism) este caracterizată prin tulburări multiple determinate atît de deficiența în somatotropină, cît și de afectarea celorlalte funcții endocrine (insuficiență sexuală, tiroidiană, corticală).

Hipersecreția de somatotropină (determinată de tumori ale celulelor secretante specifice) se manifestă prin gigantism sau prin acromegalie. Excesul de hormon de creștere pînă la pubertate cînd cartilajele de creștere nu sînt închise duce la o creștere exagerată în lungime a oaselor, în special ale membrelor inferioare și ale trunchiului — gigantism. La adult, hipersecreția somatotropă determină hipertrofierea oaselor în grosime (în special a mandibulei, a extremităților membrelor), acromegalie. Pe lîngă tulburările de creștere, hipersecreția de somatotropină este asociată cu multiple tulburări metabolice, diminuarea capacității de utilizare tisulară a glucozei duce la hiperglicemie

9.2. CORTICOTROPINA (ADENOCORTICOTROPINA)

ACTH = adenocorticotropic hormone

Polipeptid cu 39 resturi de aminoacizi (fig. XIII.13). Hormonii izolați de la diverse specii au structuri asemănătoare, diferind numai prin fragmentul cuprins între resturile de aminoacizi 25 și 33. Activitatea hormonală este

Scanned with OKEN Scanner

localizată în segmentul inițial de 24 resturi de aminoacizi. Acest peptid obținut prin sinteză este utilizat în terapeutică în locul hormonului natural.

ACTH-ul reglează funcția cortexului suprarenalelor. Numai zonele mediană, producătoare de glucocorticoizi și cea internă în care se sintetizează 17-cetosteroizii androgeni se află sub controlul hipofizei. Sinteza de aldosteronă localizată în zona externă nu este sensibilă la acțiunea ACTH-ului. La nivelul

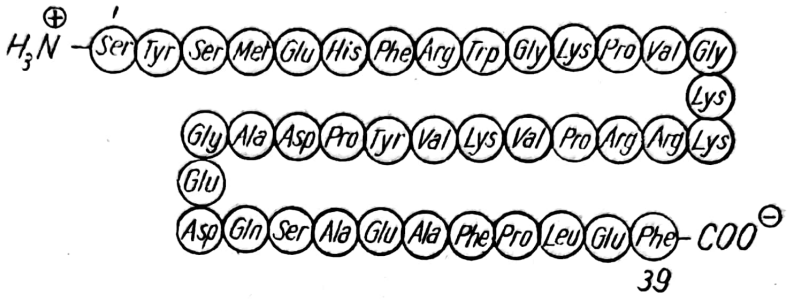


Fig. XIII.13. Structura ACTH-ului.

celulelor țintă ACTH-ul declanșează modificări morfologice (hipertrofia cortexului), stimulează sinteza de steroizi și secreția lor. ACTH-ul intervine în etapele inițiale ale steroidogenezei, de transformare a colesterolului într-un steroid cu 21 atomi de carbon (pregnenolonă).

Eliberarea de ACTH este controlată de hipotalamus prin factorul de eliberare specific (C—RF). Factori stresanți de o largă diversitate, via hipotalamus, declanșează secreția de ACTH care stimulînd activitatea cortexului determină creșterea cortisolemiei cu efecte metabolice adaptative.

9.3. **TIREOTROPINA** (HORMONUL TIREOTROP)

TSH = thyroid stimulating hormone

Hormonul uman și cel izolat de la bovine sînt glicoproteine cu greutăți moleculare de aproximativ 28 000. Activitatea biologică diferă ca intensitate de la un preparat la altul.

Tireotropina controlează morfologia și funcția tiroidei, determină hipertrofia glandei, stimulează sinteza și liberarea tiroxinei. Tireotropina intervine în toate etapele de sinteză a hormonilor tiroidieni: captarea și oxidarea iodurilor, iodurarea tireoglobulinei, eliberarea tiroxinei și a tritului în circulație. Concentrația hormonului tiroidian circulant printr-un retrocontrol homeostatic negativ reglează secreția de tireotropină: creșterea nivelului plasmatic al tiroxinei libere, determină diminuarea secreției de TSH iar scăderea tiroxinemiei stimulează secreția tropinei. Relația între hipofiză și concentrația tiroxinei în sînge se stabilește prin intermediul hipotalamusului care elaborează un factor de eliberare specific (TSH—RF).

9.4. **GONADOTROPINELE**

Funcțiile glandelor sexuale sînt controlate de doi hormoni adenohipofizari, gonadotropine: *hormonul foliculo-stimulant* (FSH = follicle stimulating hormone) și *hormonul luteinizant* (LH = luteinizing hormone sau ICSH = interstitial cell-stimulating hormone).

Scanned with OKEN Scanner

Ambele gonadotropine sînt glicoproteine cu un conţinut relativ ridicat în zaharuri (20—25%). Gonadotropinele nu au specificitate de sex, acţiunile lor distincte la bărbat şi la femei rezultă din natura diferită a ţesuturilor ţintă, de programul lor genetic. Eliberarea gonadotropinelor din adenohipofiză este declanşată de factorul hipotalamic FSH/LH — RF.

Hormonul foliculo-stimulant la femei ca şi la bărbaţi este responsabil de întreţinerea gametogenezei, maturarea foliculului la femei şi spermatogeneza la bărbat. Se pare că FSH-ul nu intervine în sinteza hormonilor sexuali. Hormonul luteinizant la femeie stimulează ovulaţia, formarea corpului galben şi sinteza de progesteronă şi de esterogeni. La bărbat această gonadotropină stimulează sinteza de androgeni de către celulele interstiţiale.

Vilozităţile coriale din placentă produc un hormon cu acţiune asupra ovarului, denumit gonadotropină corionică (HCG = human chorionic gonadotropin). Conţinutul maximal al placentei în hormon este între luna a 2-a şi a 3-a de sarcină. Administrat la femei (negestante) determină ruperea foliculului şi formarea corpului galben. La bărbat, gonadotropina corionică stimulează sinteza de testosteronă în celulele interstiţiale. Se crede că rolul fiziologic al acestui hormon este acela de a favoriza sinteza de progesteronă de către corpul galben la începutul sarcinii.

9.5. PROLACTINA

A fost studiată mai bine prolactina izolată de la unele specii de mamifere. Este un polipeptid cu greutatea moleculară de aproximativ 25 000 daltoni.

Prolactina stimulează dezvoltarea şi activitatea glandei mamare şi la sfîrşitul sarcinii iniţiază sinteza de lapte. Prolactina este prezentă şi la bărbaţi, dar nu se cunoaşte funcţia acestui hormon.

Secreţia de prolactină este controlată de hipotalamus printr-un factor care stimulează eliberarea sa (P—RF) şi un altul care inhibă secreţia de prolactină (P—RIF).

9.6. MELANOTROPINA (HORMONUL MELANOCITOSTIMULATOR)

MSH = melanocyte stimulatory hormone

Melanotropina este sintetizată de pars intermedia hipofizei la speciile la care această porţiune este dezvoltată. La om se pare că hormonul este elaborat de lobul anterior. Hormonul uman este un polipeptid cu 22 resturi de aminoacizi (fig. XIII.14).

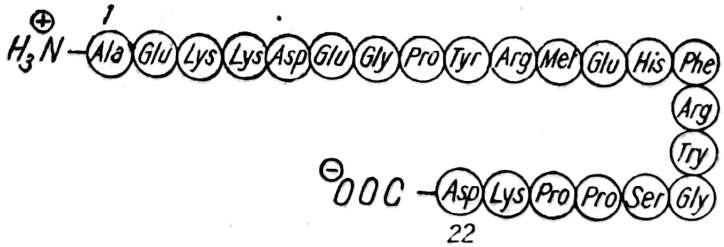


Fig. XIII.14. Structura melanotropinei umane.

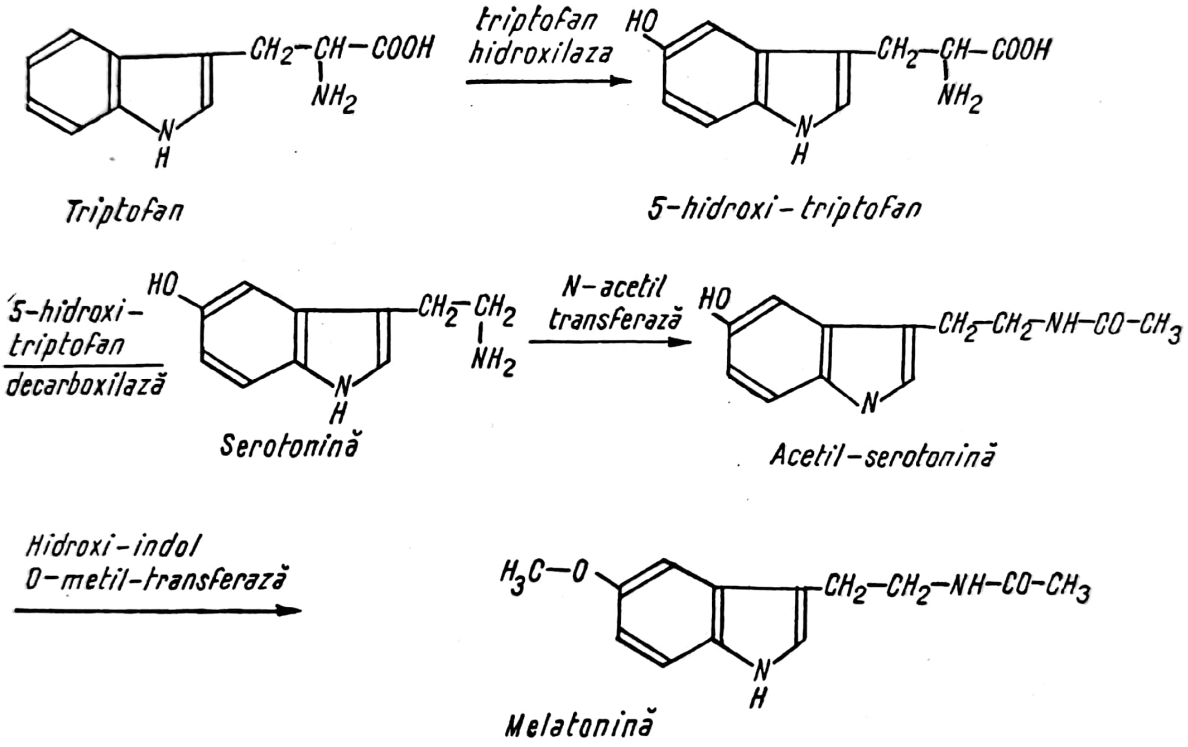
La vertebratele inferioare melanotropina are rolul de a dispersa pigmenţii melaninici în celulele melanofore determinînd închiderea tegumentului. Prin acest mecanism de pigmentare, uşor reversibil, animalele îşi ajustează culoarea pielii în raport cu cea a mediului înconjurător.

Scanned with OKEN Scanner

La mamifere nu funcţionează un sistem similar de modificare rapidă a culorii pielii. S-a demonstrat însă că la om MSH-ul stimulează formarea şi depunerea de melanine în piele. Totuşi, funcţia principală pe care o îndeplineşte MSH-ul la mamifere nu este încă cunoscută. Are rol în comportament şi determină modificări ale traseului encefalogramei.

10. **EPIFIZA** (GLANDA PINEALĂ)

Funcţia endrocrină a pinealei a fost definitiv stabilită prin descoperirea melatoninei ca produs specific al acestei formaţiuni nervoase. Melatonina, substanţă înrudită cu serotonina este sintetizată prin secvenţa de reacţii:



Hidroxiindol-O-metil-transferaza se află numai în pineală, melatonina fiind sintetizată numai în această glandă.

La vertebratele inferioare celulele pineale sînt fotoreceptive şi sinteza melatoninei variază în funcţie de expunerea organismului la lumină. Întunericul favorizează sinteza melatoninei care determină contracţia melanoforelor şi deschiderea culorii pielii (Lerner — 1958).

La mamifere pineala intervine la reglarea funcţiilor glandelor sexuale. Melatonina inhibă funcţiile gonadelor. Pinealectomia înainte de pubertate determină sexualitate precoce. La adult, tumorile pinealei sînt asociate cu diminuarea funcţiilor gonadelor. Producţia de melatonină suferă variaţii circadiene şi se admite că pineala determină variaţiile sezoniere, diurne ale funcţiilor reproductive.

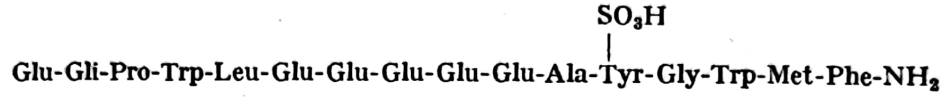
Scanned with OKEN Scanner

11. HORMONII TRACTULUI GASTROINTESTINAL

Mucoasa gastrică şi intestinală secretă mai mulţi hormoni cu roluri importante în digestie. Toţi aceşti hormoni stimulează, într-o măsură mai mare sau mai mică, secreţia de insulină dar semnificaţia acestui control asupra eliberării de insulină nu este încă evaluată.

11.1. GASTRINA

Se cunosc două substanţe: gastrina I şi gastrina II. Ambele sînt peptide formate din 17 resturi de aminoacizi. Gastrina II are următoarea structură:

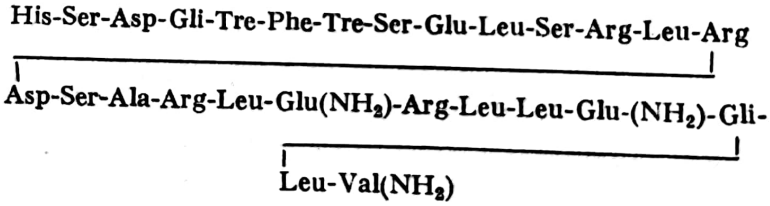


În gastrina I lipseşte restul sulfat.

Sînt elaborate de mucoasa gastrică şi duodenală şi secreţia lor este declanşată de stimularea vagului şi de contactul antrului piloric cu chimul. Rolul acestui hormon constă în creşterea acidităţii sucului gastric şi stimularea secreţiei exocrine a pancreasului, astfel încît sucul pancreatic este îmbogăţit de enzime digestive. Totodată amplifică peristaltismul stomacal şi intestinal. Hipersecreţia de gastrină de către celulele tumorale pancreatice determină hipersecreţie de HCl, ulcer gastro-intestinal (sindrom Zollinger-Ellison).

11.2. SECRETINA

Este un polipeptid (27 resturi de aminoacizi) produs de segmentele superioare ale intestinului cu structura următoare:



Secretina este eliberată cînd conţinutul acid al stomacului atinge mucoasa duodenală. Acţiunea constă într-o creştere a irigaţiei sanguine a pancreasului şi stimularea secreţiei de apă şi bicarbonat. Prin acest efect secretina joacă un rol important de neutralizare a bolului intestinal. De asemenea, secretina favorizează formarea unei bile fluide bogată în bicarbonaţi.

11.3. PANCREOZIMINA (COLECISTOKININA)

Multă vreme s-a crezut că pancreozimina şi colecistokinina sînt doi hormoni distincţi. De fapt este vorba de o substanţă unică, un polipeptid cu 33 resturi de aminoacizi. Secreţia hormonului este declanşată de contactul mucoasei intestinale cu acizi graşi, aminoacizi, ioni de hidrogen. Exercită acţiuni similare cu ale gastrinei dar de intensităţi diferite. Stimulează secreţia de enzime pancreatice fără să afecteze însă volumul sucului pancreatic şi conţinutul său în bicarbonat; are o acţiune slabă asupra secreţiei de HCl; stimulează contracţia vezicii biliare.

Scanned with OKEN Scanner

Capitolul XIV

BIOCHIMIA SÎNGELUI

Sîngele este un ţesut lichid, heterogen, alcătuit din două faze, una propriu-zisă lichidă — plasma, soluţie apoasă de protide şi săruri minerale, tamponată la pH 7,35 — şi cealaltă solidă, corpusculară, reprezentată prin eritrocite, leucocite şi trombocite, suspendate în partea lichidă. Sîngele circulă într-un sistem vascular închis, fiind menţinut în continuă mişcare prin pompa cardiacă şi stabilind astfel comunicaţia umorală între diferitele celule din ţesuturi. O concepţie sistemică, actuală şi unitară propune definirea sîngelui ca ţesut mezenchimal, derivat din mezenchimul primitiv, ce posedă multiple potenţialităţi morfo-funcţionale. Ca ţesut mezenchimal el are o componentă circulantă, sîngele periferic şi una centrală, tisulară, reprezentată prin organele hematopoietice: măduva osoasă pentru elaborarea elementelor eritro-mieloice şi megacariocitare şi organele limfoide care produc seria limfocitară. Încadrarea sîngelui ca ţesut mezenchimal are la bază faptul că toate celulele sanguine derivă din foiţa embrionară mezodermică. Celulele periferice sanguine sînt suspendate într-o substanţă fundamentală fluidă, a cărei compoziţie asemănătoare în bună parte cu substanţa fundamentală din alte ţesuturi mezenchimale, include în sistemele sale coloidale molecule proteice, complexe moleculare glicoproteice, lipoproteice. Această substanţă fundamentală „fluidă" mobilă, îmbibă dealtfel şi celulele din organele hematoformatoare, măduva osoasă şi sistemul limfoid. Sistemele vasculare, în care circulă sîngele şi limfa, sînt în legătură strînsă şi permanentă cu sistemul lacunar al spaţiilor intercelulare, în care se găseşte lichidul interstiţial (15% din greutatea corporală totală), ce reprezintă adevăratul mediu intern al organismului.

Datele de biochimia sîngelui prezentate în cele ce urmează se referă exclusiv la sîngele periferic.

1. FUNCŢIILE SÎNGELUI

Dată fiind poziţia sîngelui în ansamblul funcţional al sistemelelor lichide din organism — lichidul intracelular, interstiţial, intravascular — sîngele periferic are de îndeplinit cîteva roluri care — în esenţă — se pot concentra în două funcţii fundamentale:

— funcţia de transport, şi

— funcţia reglatoare homeostatică.

Scanned with OKEN Scanner

1.1. FUNCȚIA DE TRANSPORT

Aceasta constă în vehicularea — în dublu sens, intrare și ieșire — a tuturor substanțelor necesare vieții celulare, sau a celor rezultate din metabolismul intermediar. Dintre principalele substanțe transportate sînt, în primul rînd, cele legate de respirație, oxigenul transportat de la plămîn la țesuturi și CO_2 în sensul invers. Fiecare eritrocit conține 28 milioane molecule hemoglobină, proteină transportoare de oxigen. Urmează apoi substanțele nutritive — aminoacizi, acizi grași, oze, vitamine — provenite din tractul digestiv, precum și produsele finale ale metabolismului intermediar (uree, acid uric) vehiculate pentru eliminare prin rinichi, plămîn, piele, intestin — precum și hormonii transferați de la glandele endocrine către țesuturi țintă. Proteinele plasmatice transportate pot lega substanțe cu proprietăți hidrofobe, dispunînd de o suprafață funcțională de 700 000 m^2.

Prin proteinele transportate și proteinele plasmatice de tipul imunoglobulinelor și prin leucocitele sale, sîngele ia parte la procesul de apărare specifică a organismului. Prin proteinele anticorpi (IgG, IgM, IgA, IgD, IgE), limfocitele T și B, macrofage și plasmocite, sîngele asigură desfășurarea proceselor imune față de agenții infecțioși — virusuri și bacterii — sau proteine străine. Prin componentele de tipul proteinei C-reactive, sistemului complement, properdinei, lizozimului, sîngele participă la desfășurarea mecanismelor de apărare nespecifică. Prin leucocite și procesul de fagocitoză pe care acestea îl îndeplinesc, sîngele participă la apărarea organismului.

Funcția de transport are deci trei principale componente: respiratorie, nutritivă și de apărare.

1.2. FUNCȚIA REGLATOARE HOMEOSTATICĂ

Se realizează cu următoarele componente:

— *izoionie*, sau păstrarea constantă a concentrațiilor și raporturilor ionice (cationii Na^+, K^+, Ca^{++}, Mg^{++}; anionii Cl^-, $H_2PO_4^-$, HCO_3^-) și a echilibrului acido bazic cu menținerea concentrației ionilor din hidrogen la pH 7,35;

— *izotonia*, sau menținerea la nivelul constant a presiunii osmotice a sîngelui, proporțională cu numărul de molecule de compuși nedisociați și cu numărul de ioni ai electroliților ce se găsesc în soluție, dintre care, ionii de Na^+, Cl^-, HCO_3^- răspund de 85% din presiunea osmotică totală. Orice mărire a presiunii osmotice într-unul din sectoarele hidrice (intravascular, extracelular, intracelular) trebuie să fie compensată în condiții fiziologice, prin modificări de volum hidric. Izotonia este deci corelată cu menținerea constantă a volumului sanguin sau volemia. Datorită conținutului său proteic, în special nivelului de concentrație al albuminelor serice, sîngele exercită o presiune coloid-osmotică datorită căreia faza lichidă este menținută în sistemul vascular;

— *izotermia*, sau menținerea constantă a temperaturii corpului. Ea se realizează datorită fazei lichide a sîngelui. Căldura specifică, foarte ridicată a apei, face posibilă distribuirea în întregul organism a căldurii ce s-ar putea produce prin reacțiile exoterme la nivelul organelor metabolice extrem de active cum este, de exemplu, ficatul.

Scanned with OKEN Scanner

2. VOLUMUL SANGUIN

Sîngele reprezintă 5—7,5% din greutatea corporală, corespunzînd la adult unui volum total de 4,5—5 litri, adică 65—76,7 ml/kilocorp. Fiind constituit din două faze — una lichidă şi alta solidă, reprezentată în special de globulele roşii — sîngele este un fluid vîscos, datorită în special acestei ultime componente, ce măreşte frecarea interioară. Vîscozitatea sîngelui total este cuprinsă între 4 şi 6 poises la 38°C iar a plasmei — determinată mai ales de proteine — este de numai 1,60—2,1.

Densitatea medie a sîngelui, 1 056, este tot o rezultantă a densităţii celor două faze componente (lichidă şi solidă). Trebuie menţionat că prin coagularea sîngelui şi retracţia cheagului lichidul ce se liberează reprezintă *serul sanguin* care echivalează cu plasma, minus fibrinogenul reţinut de cheag.

2.1. VALORI RELATIVE ALE VOLUMELOR ERITROPLASMATICE

Volumele relative ale celor două faze ale sîngelui variază cu vîrsta, sexul, starea fiziologică sau patologică a unui subiect. Elementele corpusculare — printre care eritrocitele sînt preponderente — ocupă la normal 40—45% din volumul total al sîngelui; la bărbat variind între 42—52%, iar la femei între 37—47%. Acest procent, corespunzător volumului elementelor corpusculare din sîngele total, este denumit curent *hematocrit*. Denumirea vine de la faptul că sîngele făcut incoagulabil, prin adăugarea unui anticoagulant (heparină, oxalat, citrat, EDTA), este centrifugat într-un tub gradat exact, hematocritul. În acesta se separă partea lichidă de cea solidă a cărei înălţime se citeşte cu uşurinţă pe tub. Deasupra coloanei de globule roşii se formează un mic disc alburiu de globule albe. Valoarea hematocritului periferic este uşor diferită de aceea a hematocritului corporal — H_c —, legate fiind prin relaţia: $H_c = H_p \times 0{,}855$. Diferenţa dintre cele două valori este datorată dimensiunilor variate ale diametrelor vasculare şi a gradului de vîscozitate intravasculară corespunzătoare. Hematocritul exprimă printre altele şi schimbul de lichid dintre sînge şi compartimentul extravascular. În patologie hematocritul creşte în policitemie şi scade în cursul anemiilor.

2.2. VOLUMUL SANGUIN TOTAL

Suma celor două volume, globular şi plasmatic, reprezintă volumul sanguin total. Metodele folosite pentru determinarea spaţiilor ocupate de lichide în organism se bazează pe tehnica diluţiei, adică a distribuţiei unei substanţe indicatoare (colorant sau radionuclid) în compartimentul explorat. Coloranţii folosiţi pentru măsurarea volumului plasmatic (albastru Evans, albastru Chicago 6B) se fixează pe albumina serică în proporţie de 8—14 moli/mol de albumină. Dintre trasorii radioactivi ce se folosesc în acest scop, menţionăm ^{51}Cr, ^{32}P, pentru determinarea spaţiului globular, serumalbumina umană marcată cu ^{131}I. Se aplică metoda dublului marcaj, în două variante:

— *marker* plasmatic colorant şi *marker* globular radioactiv;

— ambii *marker*-i, plasmatic şi globular, radioactivi.

Scanned with OKEN Scanner

Volumul V se deduce din relaţia $V=\frac{i}{c}$ în care i=cantitatea de substanţă injectată, iar c=concentraţia plasmatică a acesteia. Concentraţia *marker*-ilor radioactivi se măsoară prin numărul de impulsuri pe minut.

Volumul sanguin este proporţional cu greutatea. La persoanele cu talie şi greutate medie (70 kg), volumul globular reprezintă aproximativ 3% din greutatea corpului, iar cel plasmatic 4,5%; volumul total corespunde în acest caz la 7,5% din greutatea totală. Prin metoda dublului marcaj, volumul globular mediu este de 30,9 ml/kg corp ($\pm$2,7); volumul plasmatic mediu este de 45,8% ml/kg corp $\pm$3,1 iar volumul sanguin total este desigur egal cu suma celor două valori, adică 76,7 ml/kg corp. În patologie volumul globular creşte în poliglobulii. Dintre variaţiile volumului plasmatic pot fi menţionate hipovolemia sindromului nefrotic, hipovolemia acută din şocul traumatic, posthemoragic sau din anemiile şi hipovolemiile cronice din cursul denutriţiilor severe (caşexie canceroasă, cancer al esofagului etc.).

3. ELEMENTELE FIGURATE ALE SÎNGELUI

3.1. ERITROCITELE

Cantitatea totală de globule roşii este de circa 25 miliarde de elemente produse cu un debit de 2,4 milioane pe secundă. Ele dispun de o suprafaţă totală de 3 800 m^2. Fiecare milimetru de sînge conţine 4—6 milioane de globule roşii cu o durată medie de viaţă cuprinsă între 110—130 zile. Ca elemente mature eritrocitele au forma unui disc biconcav, al cărui conţinut lichid este menţinut închis prin membrana celulară. La adulţi ele provin din celula de origine (*stem-cell*) prin eritropoieză medulară sub influenţa hormonului eritropoietină (de origine renală). În cursul diviziunii proeritroblaştilor începe sinteza hemoglobinei, principala substanţă proteică cu funcţie de transport de oxigen din viitorul eritrocit. Eritroblaştii sînt aşezaţi „în insule", centrate de o celulă reticulară care foarte probabil îi alimentează în cursul procesului de maturaţie. Prin procesul de maturaţie, simultan cu intensificarea aceluia de biosinteză a hemoglobinei, începe procesul de dezagregare a nucleului care este apoi eliminat şi preluat de celula reticulară centrală. Eritrocitul anucleat trece în circulaţie ca element corpuscular care însă păstrează capacitatea de a sintetiza oligopeptidele de tip glutation precum şi hemoglobină dar nu şi alte proteine.

Energia cerută pentru aceste sinteze cît şi pentru întreţinerea structurii şi formei discoidale, a permeabilităţii selective a membranei, este furnizată de ATP, sintetizat prin „fosforilarea de substrat" în cursul glicolizei anaerobe (cu intervenţia enzimelor 3-gliceraldehid-fosfat-dehidrogenază şi fosfoenol-piruvatkinază).

Eritrocitele tinere, trecute în circulaţie, posedă un reticul format din ARN ribosomal, colorabil prin brillant-cresil blau. Ele sînt denumite reticulocite. Viaţa limitată a eritrocitelor ar putea fi explicată, în parte, pe baza faptului că biosinteza proteinelor enzimatice nu este posibilă în lipsa informaţiei genetice — prin pierderea nucleului — a ribosomilor şi mitocondriilor şi odată cu aceştia, a capacităţii de intensă fosforilare oxidativă. În citosolul celulei rămîne intensă însă calea glicolitică anaerobă, prezente fiind şi enzimele şuntului pentozic.

Scanned with OKEN Scanner

3.1.1. BAZELE MOLECULARE ALE MATURĂRII SERIEI ROȘII

Complexul proces de maturare a seriei roșii — de la celula de origine către proeritroblast trecînd prin eritroblast bazofil, oxifil, reticulocit, eritrocit matur — se petrece la adult în special, în măduva osoasă iar la făt și în condiții patologice, în ficat și splină. Prima treaptă a maturării, adică transformarea celulei de origine în proeritroblast se realizează printr-o inducție selectivă a procesului de diferențiere eritroidă, prin intervenția eritropoietinei. Procesul energetic cheie al mecanismului biochimic al maturării este respirația, a cărei scădere treptată influențează printr-o serie de modificări celelalte reacții înlănțuite. Un inhibitor specific — de natură proteică, bogat în sulf și fier — diminuează respirația, acționînd ca frenator al activității succindehidrogenazei și al NADH-citrocrom-reductazei. Viteza de inhibare a respirației este cu probabilitate hotărîtă prin ritmul de intrare a inhibitorului în mitocondrii. Alte cercetări au dovedit că mai intervin diferiți inhibitori care acționează asupra citocromoxidazei. Inhibitorul specific menționat dispare din celulele mature. Inactivarea sa se realizează printr-o reacție cu fosfatidele, în special cu cefalinele din eritrocite.

Paralel cu modificările respirației scade concentrația de ARN cît și sinteza diferitelor tipuri de ARN. Activitatea diferitelor tipuri de ARN-aze, intensă pînă în momentul trecerii de la reticulocit la eritrocit, scade brusc în momentul acestei transformări. Trecerea reticulocit-eritrocit se face în timp scurt (1—3 zile). Respirația scade masiv ajungînd la 1/50 din valoarea inițială, corespunzătoare formelor tinere. Glicoliza anaerobă este micșorată dar rămîne totuși intensă iar diferitele capacități de sinteză se reduc în sensul menționat deja, odată cu dispariția ultrastructurilor, nucleu, ribosomi, mitocondrii. Concentrația în ATP scade ajungînd la mai puțin de 1/2 din nivelul caracteristic celulelor tinere. Cu pierderea ribosomilor, ce conțin cea mai mare parte din ARN, dispare reticulul caracteristic reticulocitelor, colorabil prin coloranți bazici. Reticulocitoza este un indicator periferic al eritropoiezei. Nu se cunosc cu precizie cauzele care limitează viața hematiei, dar se poate invoca o corelație probabilă prin pierderea informației genetice, a ribosomilor și mitocondriilor, elemente fără de care biosinteza proteică nu mai este posibilă. După cele maximum 130 de zile de viață, eritrocitele sînt degradate în sistemul reticulo-endotelial din splină, măduva osoasă și ficat, cu producerea de bilirubină din nucleul porfirinic al hemoglobinei. Fierul liberat din nucleul hemic și aminoacizii proveniți din degradarea globinei pot fi reutilizați în biosinteză.

3.1.2. COMPOZIȚIA CHIMICĂ A ERITROCITELOR

Hematiile conțin 60% apă și 35% substanțe solide. Compoziția globală a eritrocitelor ar putea fi apreciată — după Ponder, Granick și Cazal — în modul următor: din 1 000 mililitri globule roșii, ce corespund la 1 097 g, 707 sînt reprezentate de apă — din care 500 g liberă și 206 g legată. Reziduul uscat — 390 g — ar corespunde la 330—360 g hemoglobină, 16,7 g alte substanțe solubile și 13,3 g stroma.

3.1.2.1. *Componente minerale.* Compoziția minerală a hematiilor este variabilă cu specia, avînd totuși un caracter comun, acela de a fi total diferită — ca distribuție procentuală — de aceea a plasmei. Dintre cationi,

Scanned with OKEN Scanner

K^+ reprezintă elementul preponderent, în medie 125 mEq/l (4,8 g/l, în medie, cu variaţie între 3,9—5,5 g/l) în timp ce Na^+ are un nivel de numai 20 mEq/l iar plasma conţine 142 mEq/l. De asemenea, Ca^{++} are un nivel de patru ori mai scăzut decît în plasmă (0,025 g/l). Dintre anioni, predomină Cl^- însă, ca şi Na^+, într-o concentraţie mult mai scăzută decît în plasmă, atingînd nivelul de 50—60 mEq/l, în timp ce în plasmă el este de 103 mEq. De asemenea, anionul bicarbonic, cu o concentraţie de 15 mEq, este mai scăzut decît în plasmă. În schimb, anionii organici — hemoglobina, acidul difosfogliceric, acidul adenozindifosforic — sînt în concentraţie ridicată (75 mEq/l) în timp ce în plasmă sînt reprezentaţi numai prin proteine cu o concentraţie de 15 mEq/l.

3.1.2.2. *Componente organice nehemoglobinice.* Prezentarea componentelor organice ale eritrocitului a fost împărţită în mod deliberat, în componente nehemoglobinice şi hemoglobinice, deoarece datele biochimice referitoare la aceste substanţe fundamentale pentru funcţia eritrocitului pot fi mai bine integrate în ansamblul biologiei moleculare a celulei, după descrierea particularităţilor metabolice şi energetice ale acesteia.

În privinţa componentelor organice nehemoglobinice pot fi subliniate, de la început, cîteva aspecte discriminatorii faţă de alte ţesuturi. Ureea, ca şi glucoza, are un nivel scăzut în raport cu valorile plasmatice, dar „in vitro" concentraţiile eritroplasmatice se egalează. Colesterolul este preponderent în stare liberă, spre deosebire de plasmă în care 2/3 este esterificat. O caracteristică a compoziţiei eritrocitului este reprezentată de varietatea, repartiţia şi concentraţia relativ mare a compuşilor fosforilaţi, nucleotizi, fosfolipide, acid 2-3-difosfogliceric, hexozo-fosfaţi. Nivelul adenin nucleotizilor este precumpănitor realizat prin prezenţa de ATP, ADP, NAD, NADH, NADP, NADPH.

Glutationul sanguin este localizat — în totalitate — în eritrocite, atingînd nivelul de 0,280—0,340 g/l. Forma sa redusă este preponderentă şi importantă fiziologic, ca activator al enzimelor tiolice şi ca factor de întreţinere a integrităţii membranei eritrocitare. El este păstrat în stare redusă sub acţiunea glutation-reductazei, al cărei deficit determină un tip de anemie hemolitică. Este de reţinut şi faptul că cea mai mare parte din acidul nicotinic şi amida sa circulantă se găsesc în eritrocit. Hematiile mai conţin şi cantităţi mici de protoporfirine (0,3 mg/l) şi urme de coproporfirine (0,02 mg/l).

3.1.2.3. *Enzime.* Bogăţia enzimatică a eritrocitului este remarcabilă şi profilată pe particularităţile sale metabolice şi funcţionale, ce vor fi prezentate mai departe. Este de subliniat în primul rînd, prezenţa tuturor enzimelor glicolitice, bogăţia caracteristică a eritrocitului în 2,3-difosfoglicerat-mutază care asigură sinteza acidului 2,3-difosfogliceric (ciclul Rapoport-Luebering).

Enzimele glicolitice eritrocitare identice cu cele din alte ţesuturi pot fi clasificate în trei categorii, în funcţie de activitatea lor măsurată „in vitro" şi raportată la un mililitru de celule:

— enzime cu activitate slabă, inferioară unui μmol/minut (hexokinaza, aldolaza, fosfofructokinaza);

— cu activitate medie, cuprinsă între 1—10 μmoli/minut (fosfohexoizomeraza, fosfoglucomutaza, enolaza, piruvatkinaza);

— cu activitate puternică, mai mare de 10 μmoli/minut (triozofosfatizomeraza, gliceraldehidfosfatdehidrogenaza, fosfogliceratkinaza, lactatdehidrogenaza).

Scanned with OKEN Scanner

Este de subliniat faptul că cele două kinaze (hexokinaza și fosfofructokinaza), ce catalizează reacțiile de fosforilare, producerea hexozomono- și difosfaților, în dauna ATP, au activitate slabă. În schimb, enzimele ce intervin în refacerea rezervelor de ATP (fosfogliceratkinaza, piruvatkinaza) au activitate puternică. Hematiile conțin, de asemenea, acetilcolinesterază cu acțiune specifică asupra acetilcolinei (spre deosebire de pseudocolinesteraza din ser), fosfataze, catalază, anhidraze carbonice. Acestea din urmă există în trei forme A, B, C și sînt metalenzime cu Zn (1 atom Zn/mol) cu o greutate moleculară de circa 30 000 daltoni. Se deosebesc prin mobilitatea lor diferită, în electroforeza de zonă, A fiind forma rapidă ce migrează la nivelul HbA 2 iar B și C, forme mai lente. Cantitativ, enzima B este cea mai abundentă iar forma C cea cu specificitate maximă. În ultimul timp se atribuie acestor izoenzime importanță în patologia renală. Cu valoare funcțională în eritrocit sînt și enzimele șuntului pentozic; în general, glucozo-6-fosfatdehidrogenaza cît și complexul enzimatic care asigură reducerea la hemoglobină a micilor cantități de methemoglobină (hemiglobină) formate în condiții normale. În aceste sisteme intervin patru enzime: NADH-dehidrogenaza I (vechea diaforază), $NADH_2$ — dehidrogenaza II, NADPH — dehidrogenaza A, NADPH — dehidrogenaza B. Cea mai activă în sistem — reprezentînd 2/3 din intervenția catalitică — este NADH-dehidrogenaza I, al cărei deficit determină methemoglobinemia, în timp ce carența acumulată a celorlalte trei nu este suficientă pentru a determina apariția sindromului. În eritrocit se găsește, ca și în alte țesuturi, galactozo-1 fosfat-uridil-transferaza, al cărei deficit determină boala metabolică înnăscută numită galactozemie (vezi capitolul privind metabolismul glucidelor).

3.1.3. COMPARTIMENTELE FUNCȚIONALE ALE ERITROCITULUI

3.1.3.1. *Citosolul.* Prin fracționarea citolizatelor eritrocitare se obțin două componente: stroma și citosolul. Acesta este un lichid supernatant ce conține hemoglobina și celelalte proteine nehemoglobinice, enzimele glicolizei anaerobe și ale șuntului pentozic, catalaza, carbonicanhidrazele, glutationul (2,3 m moli/l), compușii adenilici (în special ATP, ADP, 3 m moli/l), 2,3-difosfogliceratul (4—5 m moli/l). La periferia globulului roșu se găsește o proteină, contractilă, spectrina, care menține forma biconcavă a discului.

3.1.3.2. *Stroma.* Este alcătuită preponderent din membranele celulare și, în mai mică proporție, din ultrastructuri interne. Ea cuprinde proteine (60—70%) și lipide (30—40%); în special, cefaline (fosfatidiletanolamină, fosfatidilserină), lecitine — sfingomieline, colesterol, esteri de colesterol, glicolipide și gliceride. Principalul component proteic al stromei este o oligoproteină, reticulina. Glicoforina este glicoproteină membranară.

Delipidări succesive ale reticulinei, prin eteri și alcooli, au permis stabilirea unor concluzii referitoare la compoziția acestei glicoproteine și a derivatelor sale. Reticulina este alcătuită din lipide eterosolubile și elinină care antrenează cea mai mare parte a antigenelor de grup sanguin. Din elinina delipidată prin alcooli se obține stromatina.

3.1.3.3. *Membrana eritrocitară.* Membranele preparate într-o stare de puritate înaintată (fără hemoglobină) prezintă anumite activități enzimatice. Fosforibo-izomeraza, fosfocetopentozo-epimeraza, transcetolaza, prezente în

Scanned with OKEN Scanner

membrane alcătuiesc o secvență ce dă naștere fosfogliceraldehidei. Enzimele fosfogliceraldehid-dehidrogenaza și fosfoligeratkinaza, catabolizînd oxidarea aldehidei menționate, permit formarea de ATP. Cele două enzime sînt orientate într-un anumit fel și anume: dehidrogenaza către interiorul globulului roșu, iar kinaza către mezostratul fosfolipidic al membranei. Această dispoziție favorizează utilizarea intracelulară a fosfogliceraldehidei și folosirea ortofosfaților pentru a forma în membrană ATP. Este posibil ca acest ATP intramembranar, direct accesibil ATP-azei locale, să constituie substratul de electie care furnizează energie transportului activ de Na^+ și K^+ prin membrana eritrocitară. Cu probabilitate se admite că 1/3 din energia produsă prin glicoliza anaerobă este valorificată în procesul de transport activ al cationilor prin membrană. Membrana eritrocitară este impermeabilă pentru fosfoderivații ce se formează în timpul glicolizei, în timp ce este permeabilă pentru glucoză și acid lactic. Ea oprește de asemenea nucleotizii adenilici și piridinnucleotizii, care nu difuzează în plasmă, decît ca urmare a alterării proprietăților fizico-chimice ale membranei. Încercările de terapie enzimatică substitutivă în unele tezaurismoze lizomozale (glicosfingolipidaze) aplică sechestrarea enzimei deficitare în hematii autologe, în care membrana eritrocitară funcționează ca și cea din liposomii artificiali.

3.1.4. METABOLISMUL ERITROCITULUI MATUR

3.1.4.1. *Caractere particulare.* Deși eritrocitul posedă o intensă activitate metabolică el are următoarele trăsături caracteristice:

— *consum slab de oxigen* și anume, 5 µl/h/ml de hematii;

— *absența sistemului citocromic*, cu dispariția — în cursul maturației — a enzimelor ciclului acizilor tricarboxilici, cu excepția a patru dintre ele: fumaraza, malatdehidrogenaza, aconitaza, izocitratdehidrogenaza;

— *degradarea glucozei pe două căi* și anume: 92% pe cale glicolitică Embden-Meyerhof și 8—11% pe calea șuntului pentozic (formatoare de $NADPH_2$). După alți autori, numai 4,3% din glucoză se degradează pe această cale. După Cartier șuntul pentozic eritrocitar reprezintă doar un relicvat metabolic;

— *prevalența glicolizei anaerobe ca sursă de energie*, cu utilizare exclusivă a glucozei ca substrat;

— *în cursul glicolizei anaerobe* în eritrocit se acumulează la concentrație ridicată doi fosfoderivați, ce nu există decît în stare de urme în alte țesuturi: a) 2,3-difosfogliceratul generat prin ciclul Rapoport-Luebering, derivat al căii glicolitice, din care o parte este combinată cu AMP sub formă de adenilat-2,3-difosfoglicerat; b) glucozo-1,6-difosfatul sau manozo-1,6-difosfatul*;

— *procesele metabolice eritrocitare* fac posibile: menținerea structurii celulare, păstrarea hemoglobinei în stare funcțională, menținerea compoziției substanțelor organice, în proporțiile specifice eritrocitului, menținerea diferenței de concentrație eritro-plasmatică a cationilor.

3.1.4.2. *Glicoliza anaerobă* (ciclul Rapoport-Luebering al 2,3-difosfogliceratului.) În acest subcapitol se vor scoate în evidență particularitățile gli-

* Cele două tipuri de compuși fosforici, 2,3-DPG și GL-1, 1,6-DP, intervin în cantități infime, cu rol de coenzime, în reacții fosfomutazice. Fenomenul se petrece însă și în alte celule.

Scanned with OKEN Scanner

colizei anaerobe eritrocitare, cu referire la semnificaţia funcţională cinetică şi la mecanismele de reglare a procesului.

Caracteristica esenţială a metabolismului glicolitic eritrocitar este tocmai existenţa unei derivaţii a căii glicolitice principale, numită ciclul Rapoport-Luebering, care conduce la acumularea de 2,3-difosfoglicerat. Astfel, alături de calea principală a glicolizei, în care prin acţiunea fosfogliceratkinazei

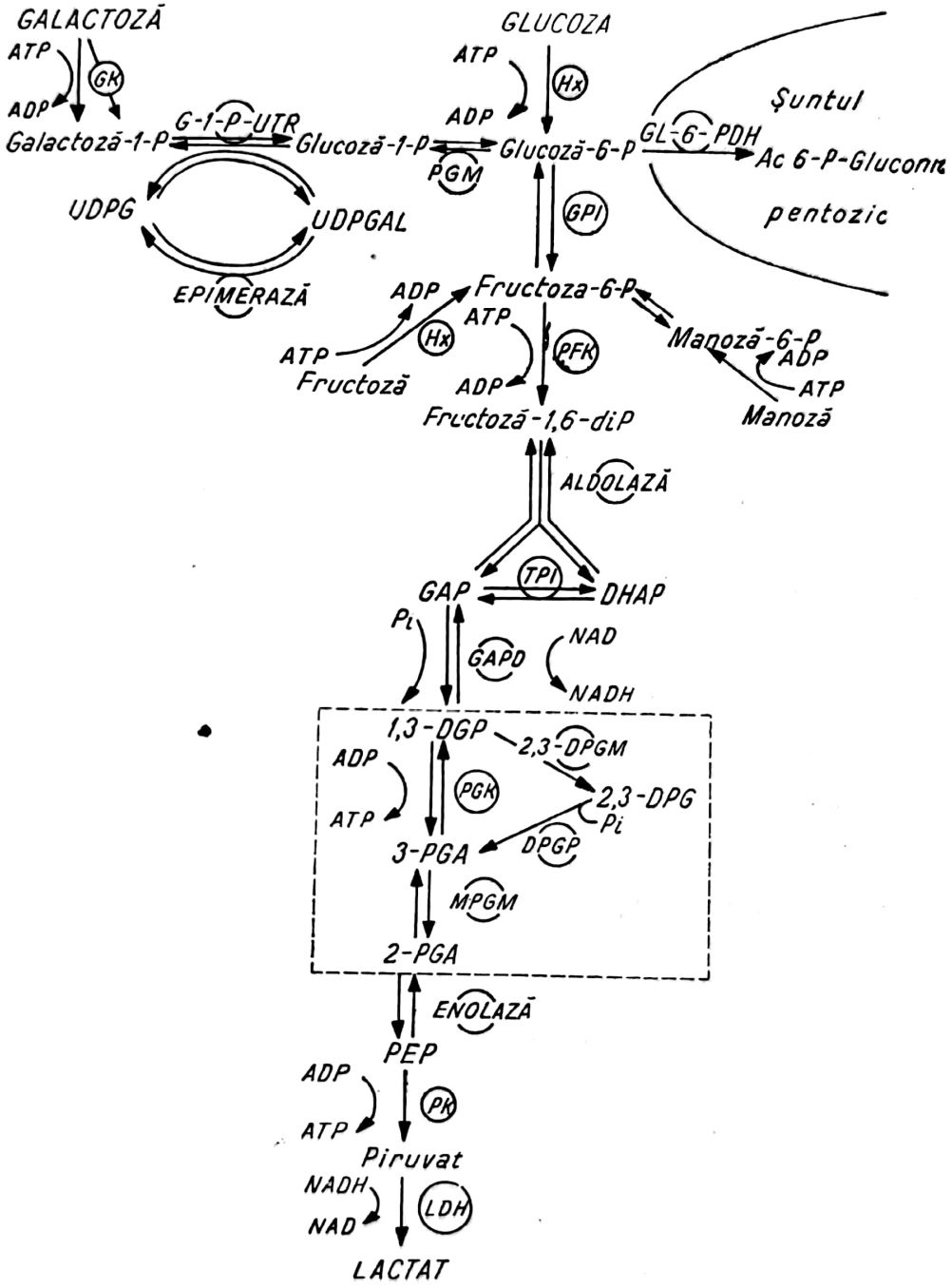


Fig. XIV.1. Glicoliza anaerobă eritrocitară cu derivaţia sa caracteristică, ciclul 2-3 difosfogliceratului (Rapoport-Luebering).

ADP este fosforilat în ATP, există şi această a doua cale ce nu produce ATP. Sinteza de 2,3-DPG implică acţiunea unei 1,3-DPG mutaze (M) ce foloseşte 3-PG, drept coenzimă, transformînd ireversibil 1,3-DPG în 2,3-DPG (fig. XIV.1). Acesta din urmă este hidrolizat în 3 PG printr-o fosfatază spe-

Scanned with OKEN Scanner

cifică 2,3-DPG-fosfataza (sau 2,3-fosfogliceratataza), puternic inhibată de produsul reacţiei, 3-PG. Constanta Michaelis (K_m) a acestei enzime faţă de substratul său, 2,3-DPG, este mare ($6 \cdot 10^{-4}$M), deci enzima are afinitate mică faţă de substrat. Enzima este limitantă a ciclului Rapoport-Luebering, justificînd prin această poziţie a sa acumularea de 2,3-DPG în condiţii de echilibru fiziologic eritrocitar. Conţinutul eritrocitar în 2,3-DPG variază cu specia mamiferelor. Rezerva ridicată de 2,3-DPG este însoţită şi de o valoare mare a concentraţiei K^+ eritrocitar şi invers. Ciclul fosfogliceratului are caracter autocatalitic. Astfel, 3-fosfogliceratul este în acelaşi timp catalizator al reacţiei mutazice prin care se formează 2,3-difosfoglicerat, inhibitor al reacţiei 2,3-fosfoglicerat-fosfatazei şi substrat al fosfogliceratmutazei. Semnificaţia fiziologică a ciclului Rapoport-Luebering, cu acumularea de 2,3-DPG, este încă discutată. Totuşi, actualmente sînt plauzibile patru interpretări ce pot fi menţionate şi luate în consideraţie.

a) Esterul constituie o *rezervă energetică* (un fel de fosfagen stabil cum spune Cartier), utilizabilă în condiţii de inhibare a degradării glucozei. În sîngele conservat formarea lactatului are loc iniţial, în dauna 2,3-DPG, care dispare complet în primele două săptămîni de conservare la +4°C. Utilizarea esterului frînează epuizarea rezervelor de ATP. Din 3-fosfoglicerat se poate produce suplimentar ATP prin acţiune piruvatkinazică.

b) Difosfogliceratul joacă un *rol în transportul activ al cationilor*, cînd glicoliza este inhibată (diminuare de ATP), ieşirea K^+ din eritrocit este reglată prin degradare de 2,3-DPG.

c) Se atribuie ciclului fosfogliceratului un rol în reducerea methemoglobinei: acumularea de 2,3-DPG, pornind de la PGA, are loc paralel cu formarea de NADH, disponibil pentru activitatea NADH-methemoglobin-reductazei.

d) La concentraţia sa intraeritrocitară 2,3-DPG lucrează ca un puternic regulator al proprietăţilor allosterice ale hemoglobinei, favorizînd rolul de donator de oxigen al acesteia către ţesuturi în condiţii fiziologice.

Referitor la producerea şi acumularea de glucozo-1,6-difosfat pot fi scoase în evidenţă următoarele aspecte: sinteza de Gl-1,6-DP s-ar face plecînd de la Gl-1-P sau Gl-6-P, printr-o reacţie kinazică. Dar fosforilarea nu se face pe seama ATP-ului, ci a 1,3-DPG printr-o reacţie de transfosforilare:

$$G_1P + 1,3\text{-DPG} \longleftrightarrow G\text{-}1,6\text{-DP} + 3\text{-PG}$$

Rolul metabolic al G-1,6-DP este însă obscur şi acumularea sa nu poate fi corelată cu transformarea glucozei în glicogen, hematia fiind practic lipsită de glicogen. Bartlett semnalează în eritrocit şi prezenţa manozo-1,6-difosfatului (M-1,6-DP), compus care nu a fost găsit niciodată în ţesuturile animale.

3.1.4.3. *Echilibrul dintre cele două secvenţe metabolice, glicoliza anaerobă şi calea difosfogliceratului.* Acest echilibru este foarte important şi reglat prin concentraţia în ADP. Cînd raportul ATP/ADP este scăzut, reacţia kinazică sus citată transformă 1,3-DPG în 3-PG (care inhibă 2,3-DPG-fosfataza). Aceasta generează lactat cu sintetizarea a două molecule de ATP. Cînd valoarea raportului ATP/ADP este mare, predomină acumularea de 2,3-DPG. În globulul roşu matur, cînd nucleotizii adenilici sînt în concentraţie fiziologică, ATP are valoarea cea mai ridicată şi raportul ATP/ADP este de asemenea crescut. Factorul hotărîtor al echilibrului adenilic este însă ADP. Acesta

poate fi transformat în ATP prin două sisteme enzimatice prezente în eritrocit dintre care unul activează în ciclul glicolitic (etapa fosforilării de substrat) iar celălalt este reprezentat prin reacţia adenilatkinazică, reversibilă.

Prin aceste două mecanisme nivelul ridicat al ATP-ului este menţinut deoarece ele au caracteristici funcţionale complementare. Fosforilarea glico-

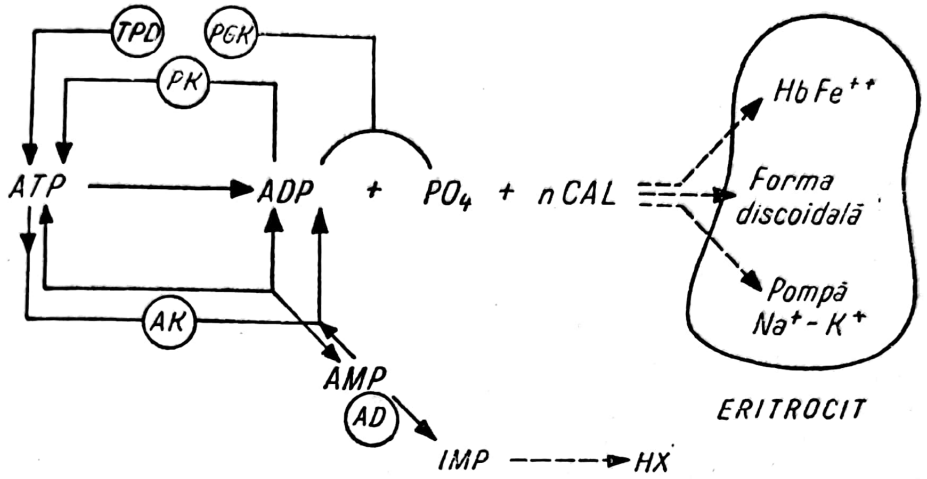


Fig. XIV.2. Mecanismul echilibrării nucleotizilor adenilici eritrocitari.

litică este complexă, activă şi lentă dar poate avea o durată prelungită pe măsura nevoilor de ATP. Procesul glicolitic însuşi este supus mecanismelor de reglare adaptativă ce acţionează în diferite puncte ale secvenţei metabolice (asupra cărora se revine mai departe) modelînd consumul de glucoză, după variaţiile concentraţiei de ATP. Reacţia adenilkinazică reprezintă un sistem „tampon energetic", pasiv, cu o acţiune limitată, prin degradarea rezervei de compuşi adenilici, pe care o poate declanşa. Refacerea rezervei de ATP este însoţită de formarea stoechiometrică de AMP, care declanşează însă dezaminarea nucleotizilor adenilici pînă la hipoxantină (HX):

$$AMP \xrightarrow{\text{AMP dezaminază}} IMP + HX$$

Dealtfel, din acest motiv, în cursul conservării sîngelui, nivelul ATP coboară după prima săptămînă de echilibrare a celor două sisteme complementare, echilibrare implicată în metabolismul nucleotizilor adenilici eritrocitari (fig. XIV.2).

3.1.4.4. *Bilanţul energetic al glicolizei anaerobe eritrocitare* corespunde celui stabilit pentru celulele ţesuturi, cu o variaţie de energie liberă, $\Delta G = -52{,}5$ Kcal/mol de glucoză. Cele mai importante denivelări de energie, în eritrocit, ca dealtfel şi în celelalte celule, sînt localizate la nivelul hexokinazei, fosfofructokinazei, piruvat-kinazei, enzime care catalizează reacţii depărtate de starea lor de echilibru. Randamentul energetic al utilizării energiei glicolitice, depozitată în ATP (14,6 Kcal/mol glucoză) este vecină cu 30%. Trebuie arătat totuşi că în ciclul Rapoport-Luebering, conversiunea 1,3-DPG în 2,3-DPG (—3,45 Kcal) şi hidroliza de 2,3-DPG în 3-PG (—11 Kcal) corespunde unei pierderi de —14,3 Kcal, echivalent cu un mol de ATP. Cantitatea de energie produsă este însă suficientă pentru întreţinerea funcţiei respiratorii a hemoglobinei, a formei discoidale a hematiei, a structurii membranei şi

menţinerii homeostaziei ionice. Schimburile gazoase de O_2 şi CO_2 sînt pasive şi se fac numai prin denivelările gradienţilor de concentraţie prin simplă difuziune.

3.1.5. MECANISMUL DE REGLARE A GLICOLIZEI ANAEROBE

Acest mecanism a fost expus, în esenţă (în capitolul IX), şi se subliniază aici doar trăsături caracteristice care derivă din ansamblul metabolic şi funcţional al globulului roşu. Dintre acestea, pot fi menţionate:

— reducerea numărului de căi metabolice, cu punct de plecare glucozo-6-P, de la patru la două. În celelalte ţesuturi glucozo-6-fosfatul reprezintă un punct de răscruce metabolică în care se întretaie patru căi: glicogenogeneza, liberarea glucozei, calea glicolitică a hexozodifosfaţilor şi calea oxidativă a pentozofosfaţilor. În eritrocit Gl-6-P este solicitat numai de ultimele două căi metabolice, dintre care cea glicolitică este prevalentă;

— în globulul roşu sinteza proteinelor enzimatice nu este reglată prin inducţie sau represie, deoarece biosinteza acestor proteine nu mai poate fi realizată;

— dintre toate enzimele glicolitice cele trei kinaze — HK, PFK şi PK — influenţează viteza de degradare a glucozei, funcţionînd ca enzime limitante. Aceste trei reacţii kinazice se desfăşoară departe de starea de echilibru, fără să atingă deci valoarea maximă a potenţialităţii lor, limitînd astfel activitatea globală a secvenţei metabolice. Ele au în comun cîteva caracteristici ce justifică rolul lor ca factori de reglare a glicolizei anaerobe: a) au activitate slabă (mai ales HK şi PFK); b) sînt sisteme la care participă ATP (sau ADP), sisteme fosforilante, a căror activitate cere prezenţa ionilor de Mg^{++}; c) au caracter allosteric, fiind controlate prin anumiţi metaboliţi intermediari ai glicolizei anaerobe, după o cinetică de tip allosteric. În fig. XIV.3 este redată reglarea allosterică a glicolizei eritrocitare prin conţinutul de GL-6-P, FDP. Din cele trei enzime, PFK (ireversibilă, unidirecţională) apare ca etapa reglatoare cea mai importantă a glicolizei anaerobe eritrocitare. Marea sensibilitate a enzimei la variaţiile de concentraţii mici ale efectorilor sugerează că echilibrul între inhibiţia prin ATP şi dezinhibiţia [prin AMP — ADP (şi PO_4^{3-}) modelează intensitatea glicolizei.

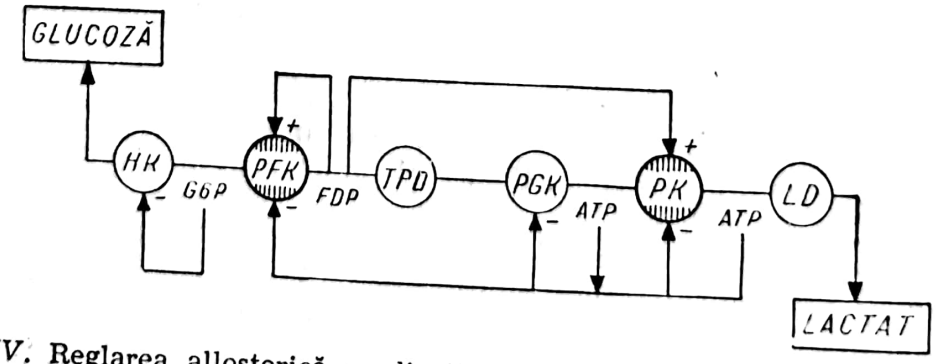


Fig. XIV. Reglarea allosterică a glicolizei eritrocitare (adaptare după Cartier).

Piruvat kinaza, enzimă unidirecţională, ce catalizează ireversibil o etapă de importantă denivelare energetică, constituie un sistem reglator foarte eficace. Ea există în două forme moleculare: interconvertibile, una de cinetică

michaeliană, iar alta de cinetică allosterică (prezentă în eritrocit). Datele cinetice privind enzimele reglatorii ale glicolizei sînt încă incomplete. Foarte interesante şi încă în curs de studiu sînt încercările de introducere a dimensiunii timp în cercetarea activităţii celor două kinaze reglatoare, ce se încadrează în sistemul de oscilaţii biochimice a căror explorare a fost iniţiată de Hess şi Brand.

3.1.6. CALEA ŞUNTULUI PENTOZIC

Această cale este importantă pentru biologia eritrocitului, legată fiind de raportul ce se stabileşte prin intermediul NADPH pe care-l generează, cu reacţiile ce condiţionează nivelul optim al glutationului redus şi în parte al reducerii methemoglobinei (fig. XIV.4). Echilibrul între nucleotizii piridinici, NAD, NADP — formele lor oxidate şi reduse — nu este încă riguros stabilit, datorită dificultăţilor de ordin tehnic. Dintre cele două sisteme coenzimatice, cuplul NAD-NADH este corelat principal cu glicoliza anaerobă, iar cuplul NADP-NADPH este strîns legat de oxidarea glucozei pe calea şuntului pentozic. În ansamblu însă concentraţia acestor nucleotizi piridinici eritrocitari este de 7—10 ori mai mică decît aceea a ficatului, organ metabolic foarte activ. O caracteristică a eritrocitului este preponderenţa formei oxidate NADP, în timp ce raportul NADPH/NADP este supraunitar în celelalte ţesuturi.

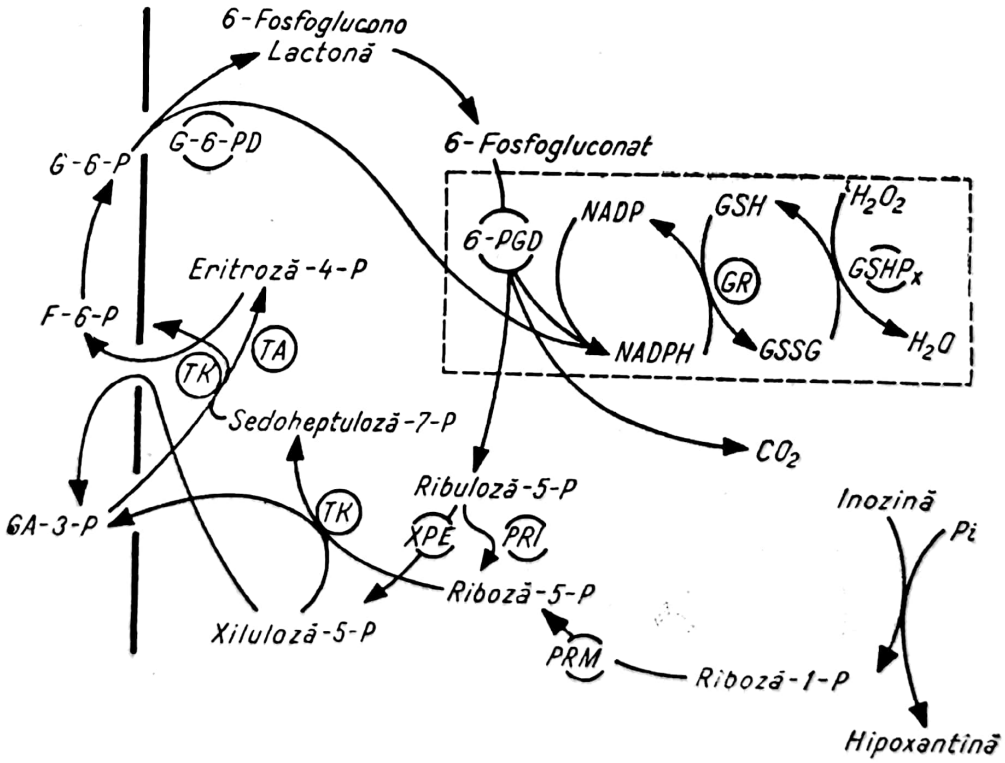


Fig. XIV.4. Şuntul pentozic: corelaţia cu metabolismul glutationului.

3.1.7. UTILIZAREA OXIGENULUI ÎN ERITROCIT

Deşi consumul de oxigen al eritrocitului este foarte mic în raport cu al altor ţesuturi, el este folosit în reacţii de autooxidare a căror importanţă este recunoscută pentru biologia eritrocitului. Fenomenele oxidative în care oxige-

Scanned with OKEN Scanner

nul este utilizat în metabolismul eritrocitar sînt următoarele trei: autooxidarea flavoproteinelor, a glutationului prin intermediul methemoglobinreductazei (diaforazei) şi probabil şi a glutation-reductazei precum şi oxidarea prin intermediul flavoproteinelor a NADH, produs prin glicoliză anaerobă. Într-o mică măsură se petrece şi oxidarea hemoglobinei în methemoglobină. Auto-

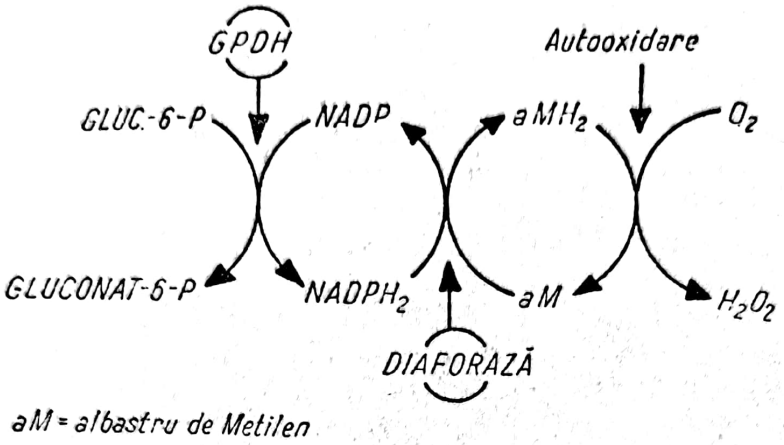


Fig. XIV.5. Oxidarea autocatalitică a albastrului de metilen în eritrocit.

oxigenarea albastrului de metilen într-un sistem de reacţie cu eritrocite şi glucoză are drept urmare creşterea consumului de oxigen (Barron Harrop, Warburg). Mecanismul reacţiei este prezentat în fig. XIV.5. Albastrul de metilen funcţionează ca acceptor intermediar de electroni, autooxidabil. Glucoza este oxidată în acest sistem pe calea şuntului pentozic. NADPH produs în această reacţie transmite electronii prin diaforază (flavoproteină) către albastrul de metilen care-i cedează oxigenului cu producere de H_2O_2*.

3.1.8. MENŢINEREA GLUTATIONULUI

Din cei 2—3 mmoli glutation/l, prezenţi în eritrocit, cea mai mare parte este în forma redusă, G-SH. Se poate produce în eritrocit din glutamat, glicină şi cisteină prin două reacţii ATP-dependente. Valoarea sa funcţională pentru eritrocit este hotărîtă prin gruparea SH a cisteinei, datorită căreia sînt protejate de oxigen SH — enzimele, membrana eritrocitară, hemoglobina ce conţine 6 grupări SH, dintre care două uşor accesibile. Formele oxidată, G—SS—G şi redusă, GSH, alcătuiesc un sistem redox, în care forma redusă reprezintă 28%. Deoarece glutationul are un potenţial redox puternic negativ ($E'_0 = -0{,}25$ V) şi este uşor oxidabil, el este regenerat continuu prin glutation reductază NADPH dependentă, coenzima fiind produsă prin şuntul pentozic. Deficitul de Gl6PDH este însoţit şi de scăderea capacităţii eritrocitului de a reduce glutationul prin micşorarea activităţii glutation reductazice, determinată prin lipsa de NADPH. Glutationul joacă un rol important şi în procesele de detoxifiere faţă de peroxizi, fie că este vorba de H_2O_2 metabolic, fie de peroxizi produşi prin autooxidarea acizilor graşi polinesaturaţi din membrana eritrocitară. El joacă rol de cosubstrat al glutation-peroxidazei, enzimă cu seleniu. Mecanismul detoxifierii prin glutation-peroxidază este

* Albastrul de metilen poate reacţiona direct cu oxigenul, catalizînd reducerea methemoglobinei. Acest efect are aplicaţie terapeutică.

redat în fig. XIV.4. Raportul între păstrarea structurii funcţionale a membranei eritrocitare şi a conţinutului în GSH se sprijină — în parte — pe acţiunea de protecţie menţionată, asupra SH enzimelor. Sistemul de detoxifiere prin glutation peroxidază este sprijinit şi de acţiunea catalazei eritrocitare.

3.1.9. ENZIMOPATII CONGENITALE

Sînt anemii hemolitice, cu deficienţe enzimatice, din lanţul glicolitic. Unele au o frecvenţă relativ mai mare. Acestea sînt cele legate de deficitul sau anomaliile de Gl6PDH şi PK care sînt dealtfel studiate din punct de vedere cinetic şi metabolic. Sînt cunoscute şi deficitele de hexokinază (cu glicoliza scăzută la 25% din valoarea normală), de hexozofosfatizomerază, de triozofosfatizomerază (extrem de rară), de 2,3-difosfogliceratmutază, cea mai bine definită biochimic, localizată în ciclul Rapoport-Luebering (cu scăderea rezervelor de 2,3-difosfoglicerat). Deficitul de piruvatkinază provoacă cea mai frecventă anemie eritroenzimopenică, după cea determinată de Gl6PDH. Dată fiind importanţa celor două anemii eritroenzimopenice determinate prin deficit sau anomalie a GL6PDH şi PK, vor fi subliniate unele aspecte caracteristice ale acestora.

3.1.9.1. *Deficitul de Gl6PDH* cît şi al celui 6-fosfogluconatdehidrogenază, influenţează puţin procesele energetice ale eritrocitului, în care predomină glicoliza anaerobă. Deficitul de formare a NADPH determină scăderi ale reducerilor la care participă această coenzimă, anume reducerea glutationului, a methemoglobinei şi probabil, a steroizilor.

Hemoliza declanşată prin anumite medicamente (primaquina) la deficitarii în Gl6PDH îşi are explicaţia într-o modificare a structurii şi deci a permeabilităţii membranei, care creşte faţă de cationi (Na^+ şi K^+). Apar şi diferite anomalii ale ATP. Se cunosc 80 variante ale acestui viciu metabolic înnăscut. Transmiterea deficitului este legată de sex. Principalele criterii şi mijloace de deosebire a variantelor moleculate de GL6PDH sînt: a) dozarea activităţii enzimatice (test optic); b) mobilitatea electroforetică (electroforeză de zonă, în special în gel de amidon); c) determinarea K_m faţă de Gl-6-P şi NADP; d) afinitatea pentru analogii structurali ai substratului (de ex. Gal-6-P); e) stabilitatea enzimei la încălzire; f) curba de activitate în funcţie de pH.

3.1.9.2. *Deficitul în piruvatkinază.* Reticulocitoza aproape constant ridicată face dificilă interpretarea datelor biochimice. În situaţii cu reticulocitoză mai mică (2—3%) şi cu un deficit de 65% din valoarea normală a enzimei s-au făcut următoarele observaţii:

— glicoliza eritrocitară este scăzută;
— nivelul ATP diminuat;
— concentraţia 2,3-DPG scăzută;
— echilibrul de oxidoreducere a nucleotizilor piridinici este deplasat în favoarea formelor reduse.

Pentru majoritatea autorilor creşterea de 2,3-difosfoglicerat ar fi caracteristica majoră a enzimopatiei acesteia, care s-ar explica printr-o trecere accentuată de la glicoliza Embden-Meyerhof către derivaţi Rapoport-Luebering, avînd drept consecinţă agravarea deficitului de ATP. Pentru depistări sînt recomandate procedeele de „screening" pe principiul folosit de Beutler — variaţiile de fluorescenţă ale formelor oxidate sau reduse ale nucleotizilor piridinici, coenzime ale enzimelor deficitare (PK, GL6PDH).

Scanned with OKEN Scanner

Nevoile energetice eritrocitare sînt destul de mici, celula fiind în incapacitate de a executa sinteze puternic endergonice. Funcţiile endergonice pe care energia glicolitică le alimentează (după cum s-a arătat) sînt: a) păstrarea hemoglobinei în stare redusă, pentru ca ea să-şi poată exercita funcţia respiratorie, de transportor de O_2 şi CO_2, preponderent dependentă de formarea de NADH în secvenţa glicolitică; b) menţinerea formei discoidale a hematiilor şi a integrităţii structurale a membranei; c) homeostazia compoziţiei ionice intraglobulare (izoionia).

3.1.10.1. *Reducerea methemoglobinei* (hemiglobinei). În eritrocitul normal, mai puţin de 1% din hemoglobină se găseşte ca methemoglobină (hemiglobină), formă oxidată cu Fe^{3+}, inactivă pentru transportul de oxigen. Pentru hemoglobina pură, în contact cu aerul transformarea este spontană, cu trecere de la Fe^{2+} la Fe^{3+}, corespunzător potenţialului de oxidoreducere. Reducerea hemiglobinei în eritrocit, pentru menţinerea hemoglobinei în stare funcţională (cu Fe^{2+}) se realizează prin intermediul methemoglobinreductazei (NADH şi NADPH diaforazele), care lucrează corelat cu cele două căi energetice de degradare a glucozei, cale de oxidare directă (şuntul pentozic), şi calea glicolitică (fig. XIV.6).

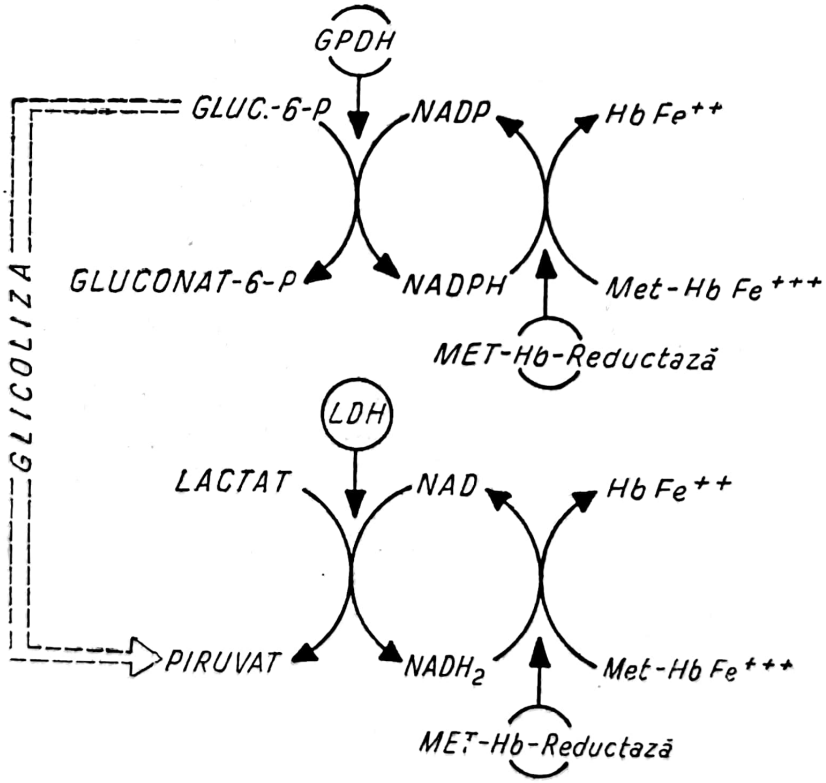


Fig. XIV.6. Reducerea methemoglobinei (hemiglobinei) eritrocitare.

Dintre cele două diaforaze, NADH — methemoglobin reductaza — este unanim recunoscută, pentru intervenţia sa în procesul de întreţinere a nivelului scăzut al methemoglobinei eritrocitare. Rolul fiziologic al NADPH-diaforazei în reducerea methemoglobinei a fost stabilit definitiv de Sass şi colab.

Scanned with OKEN Scanner

care au studiat proba cu albastru de metilen în cazul de deficit enzimatic al Gl6PDH. Proba cu albastru de metilen este negativă datorită lipsei de NADPH, antrenat prin deficitul enzimei, care declanşează oxidarea glucozei pe calea şuntului pentozic. Reacţia a devenit testul Brewer, pentru depistarea indirectă a deficitului de Gl.6PDH. NADPH diaforaza este un auxiliar preţios al tratamentului methemoglobinemiilor dobîndite, atît toxice cît şi congenitale, prin deficit de NADH diaforază. Administrarea albastrului de metilen — per os sau pe cale intravenoasă — determină reducerea rapidă a methemoglobinei prin intermediul NADPH diaforazei.

3.1.10.2. *Menţinerea formei discoidale.* Forma discoidală biconcavă a hematiilor normale este legată de doi factori determinanţi: integritatea membranei şi rezerva de ATP. Membrana eritrocitului poate fi încadrată în concepţia de unitate de structură şi funcţie a sistemelor de membrană, în sensul sugerat de Green şi Fleish, fie că este vorba de membrană plasmală, mitocondrială, microsomală sau cloroplastică. Conform acestei concepţii, membrana constituie o barieră de permeabilitate, capabilă de transport activ de ioni, contra unui gradient de concentraţie. Membranele sînt dotate cu proprietăţi contractile şi posedă activitate ATP-azică. Aceste caractere se găsesc şi în membrana eritrocitară. Încă din 1954 a fost sugerată ipoteza că membrana eritrocitară ar poseda proprietăţi contractile. În 1963 a fost extras din membranele eritrocitare un complex proteic, compus dintr-o eritroactină şi o eritromiozină, activabile prin cefaline. Acest complex, dotat cu activitate ATP-azică şi proprietăţi contractile, pare să fie implicat în transportul activ de Na^+ şi K^+. Referitor la cel de al doilea factor, încă din 1961 Nakoa şi colab. au arătat că forma biconcavă a hematiei este legată de prezenţa ATP-ului. În cursul conservării sîngelui, pe măsură ce scade rezerva de ATP, eritrocitul ia o formă crenelată şi apoi sferică. Modificările de formă apar cînd rezerva de ATP scade sub 50% din conţinutul iniţial. Modificări morfologice de tipul acesta pot fi reproduse, prin incubarea globulelor roşii cu NaF — inhibitor al glicolizei anaerobe — şi reversate prin adăugarea unui amestec de adenină, inozină şi anioni fosforici pentru refacerea rezervei de ATP.

3.1.10.3. *Homeostazia compoziţiei ionice eritrocitare.* Dintre cele trei funcţii endergonice eritrocitare, menţinerea izoioniei eritrocitare este aceea care consumă cea mai mare cantitate de energie. Se realizează atît prin transportul activ transmembranar cît şi prin difuzie pasivă (mai puţin). Rezultanta acestor două acţiuni este gradientul de concentraţie al ionilor de Na^+ şi K^+ ce se stabileşte între plasmă şi eritrocit. Inhibiţia glicolizei anaerobe tulbură echilibrul cationic. Viteza de funcţionare a „pompei Na^+K^+" depinde de nivelul la care glicoliza menţine ATP intracelular. Energia necesară pentru a acoperi travaliul osmotic şi electric, care menţine în limite fiziologice raportul de distribuţie a cationilor, este de 7,35 Kcal (după Passow). În condiţii fiziologice de hidroliză intraglobulară a unui mol de ATP se liberează 14,3 Kcal. Deci randamentul procesului este de circa 54% utilizare energetică pentru menţinerea repartiţiei fiziologice a ionilor de Na^+ şi K^+. La rîndul său, intensitatea glicolizei poate varia în funcţie de nevoia energetică provocată prin variaţiile transportului activ. Interacţiunea reciproc reglatorie dintre glicoliză şi permeabilitatea selectivă a membranei este — cu mare probabilitate — localizată la nivelul membranei (vezi 3.1.3.3). Activitatea sistemelor enzimatice TPD (triozofosfat-dehidrogenaza) şi PGK (fosfogliceratkinaza) intramembranar este strîns dependentă de nivelul intracelular al ADP, care

Scanned with OKEN Scanner

intervine ca acceptor de acid fosforic, în reacţia fosfogliceratkinazică, cu refacerea rezervelor de ATP, funcţional necesare. Dealtfel, însăşi reglarea consumului de glucoză este determinată prin variaţiile raportului ATP/ADP şi concentraţia ionului PO_4^{3-}. Efectul activator al anionului ortofosforic asupra glicolizei nu se manifestă decît asupra globulului roşu intact (nu şi în citolizat). Se socoteşte verosimil că activităţile fosfatazice legate de membrană — în special ATP-aza — să asigure un aport continuu de ioni PO_4^{3-}, în dauna fosfaţilor organici. Prezenţa ortofosfaţilor accelerează intrarea glucozei în secvenţa glicolitică anaerobă şi conversiunea sa în fructozodifosfat. Efectul accelerator este localizat la nivelul celor două etape ireversibile ale formării hexozofosfaţilor. Anume, ortofosfaţii ar reduce inhibiţia HK prin G16P (Rose) şi inhibiţia PFK prin ATP. Însă singura reacţie din calea glicolitică, ce utilizează direct ortofosfaţii (triozofosfat-dehidrogenaza), nu este influenţată de concentraţia fosfaţilor. O concentraţie ridicată de fosfaţi (în ambianţă) superioară nivelului de 30 mM inhibă glicoliza la nivelul etapelor iniţiale (între glucoză şi fosfogliceraldehidă, după Chapman). Observaţia poate fi corelată cu ceea ce se observă în cursul conservării sîngelui în ACD (acid citric-dextran): acumulare de fosfaţi, scăderea fosforului organic şi a consumului eritrocitar de glucoză. Intervenţia fiziologică a ionilor fosforici în reglarea glicolizei eritrocitare este totuşi puţin importantă, deoarece concentraţiile pentru care acest efect se manifestă „in vitro" sînt foarte departe de concentraţiile fiziologice ale fosforului eritrocitar (0,4 mM) şi plasmatic (1 mM).

3.1.11. HEMOGLOBINA

Hemoglobina este pigmentul sanguin de natură heteroproteică, a cărei sinteză continuă în eritrocit, chiar în stadiul său matur şi care prin proprietăţile sale fizico-chimice asigură funcţia fundamentală a eritrocitului de transportor de gaze (O_2 şi CO_2) între plămîn şi ţesuturi. Această hemoproteină reprezintă 1/3 din masa celulară eritrocitară. În sîngele arterial hemoglobina se găseşte numai ca oxihemoglobină. Funcţiile fundamentale ale hemoglobinei sînt:

— transportul oxigenului în sînge, cu alimentarea arderilor tisulare;

— participare la transportul CO_2 în sînge;

— participarea la menţinerea echilibrului acido-bazic şi a concentraţiei ionilor de H^+, în spaţiul extracelular, luînd parte la acţiunea de tamponare, în calitate de component al sistemelor tampon din sînge. Cantitatea de hemoglobină totală de care dispune un organism cu o greutate medie de 70 kg şi un volum sanguin de 5 litri, este de 800 g, cu o producţie medie de circa 6,35 g/zi. Concentraţia fiziologică de circa 15 g% de sînge corespunde unei încărcături medii de 32 pg* (valori extreme: 27—34 pg) pe eritrocit. Scăderea concentraţiei hemoglobinei este denumită hipocromie (în anemii cu lipsă de Fe) iar creşterea concentraţiei se numeşte hipercromie (în anemii cu lipsă de vitamină B_{12}, tip anemie pernicioasă).

3.1.11.1. *Bazele moleculare şi electronice ale proprietăţilor şi funcţiilor hemoglobinei.* Hemoglobina este o hemproteină ce are o componentă globinică şi o grupare prostetică, hemul, în care Fe^{2+} este legat de protoporfirina IX,

* pg=picogram=10^{-12} g.

provenită din protoporfirina III (1,3,5,8-metil-2,4-vinil-6-7-metilpropionat porfirină). Se cunosc 15 izomeri ai protoporfirinei III, dintre care cel prezent în hemoglobină este cel mai important regăsindu-se şi în mioglobină, enzimele respiratorii (citocromi), peroxidaze, catalază. Această cromoproteină conţine 0,338 g% fier (Drabkin). Hemoglobina are asemănare structurală cu mioglobina, deşi este mai complicată decît aceasta. Structura hemoglobinei a fost descrisă de Perutz şi colab. prin studii de difracţie cu raze X, la o rezoluţie de 2,8 Å*. S-a ajuns la concluzia că hemoglobina este alcătuită din patru lanţuri polipeptidice separate; două lanţuri α şi două lanţuri β. Principalele trăsături structurale deduse din cercetările menţionate sînt următoarele:

— cele patru lanţuri sînt aranjate aşa încît formează o structură aproximativ sferică (fig. XIV.7);

— lanţurile individuale ocupă vîrfurile unui tetraedru neregulat;

— fiecare lanţ are conformaţie foarte asemănătoare mioglobinei;

— lanţurile sînt aranjate aşa încît interacţiunile dintre lanţurile asemănătoare sînt slabe şi acelea dintre lanţurile diferite (α sau β) puternice;

— deoxigenarea hemoglobinei provoacă o schimbare marcată în structură, cu rezultatul net de apropierea celor două lanţuri α-hem la distanţa de 1 Å, cele două β-hem se depărtează la distanţa 6,5 Å. Oxigenarea hemoglobinei provoacă modificarea conformaţională de sens invers, cu apropierea celor două lanţuri β. Conformaţiile lanţurilor individuale nu se schimbă în mod detectabil. Molecula de hemoglobină are greutatea moleculară de circa 64 500—67 000. Fiecare dintre cele patru subunităţi peptidice componente corespund unei greutăţi moleculare de circa 17 000. La modul general — ţinînd seama de compoziţia tetramerică a moleculei de hemoglobină (Hgb), formula sa poate fi exprimată astfel: X_2, Y_2 în care X_2 desemnează o pereche de lanţuri polipeptidice alfa, iar Y_2 se referă la o pereche de lanţuri beta (β), gama (γ), delta (δ) sau epsilon (ε). Se realizează următoarele tipuri normale: Hgb A (adult)$=\alpha_2\beta_2$: Hgb $A_2=\alpha_2\delta_2$; Hgb F (fetală)$=\alpha_2\gamma_2$. Se mai studiază şi o hemoglobină embrionară care are lanţuri ε, încă insuficient cunoscute.

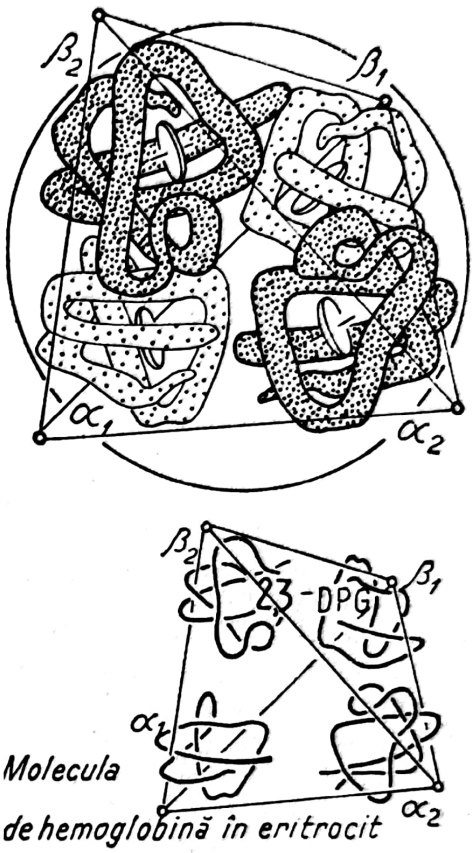


Fig. XIV.7. Structura hemoglobinei după Perutz.

3.1.11.2. *Hemoglobinele fiziologice.* Eritrocitul adultului conţine preponderent Hgb A$=$Hgb $\alpha_2\beta_2$, un procent de 2,5% Hgb $A_2=$Hgb $\alpha_2\delta_2$ şi urme

* Datorită complexităţii sale, structura hemoglobinei a fost completată cîtva timp după aceea a mioglobinei, deşi cercetările au fost iniţiate cu cîţiva ani mai înainte (Perutz şi Kendrew—Premiul Nobel 1962).

Scanned with OKEN Scanner

de Hgb F=Hgb $\alpha_2\gamma_2$. Hemoglobina fetală reprezintă 80% din cea totală la naştere şi ajunge la 1% la un an, dispărînd apoi treptat (fig. XIV.8). Se cunoaşte şi Hgb A_3, formă de îmbătrînire a Hgb A, care apare la sfîrşitul

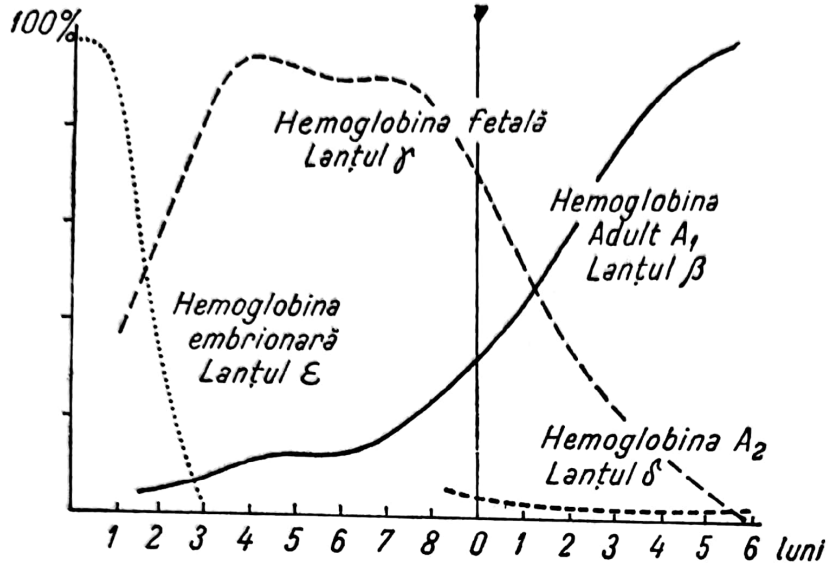


Fig. XIV.8. Evoluţia în timp a biosintezei lanţurilor β şi non-β din diferitele tipuri fiziologice de hemoglobină.

vieţii hematiilor. Fiecare dintre formele de Hgb se caracterizează prin mobilitate electroforetică, punct izoelectric, viteză de denaturare în mediu alcalin sau acid. Cele mai multe date fizico-chimice cunoscute se referă la Hgb A. Hgb F este foarte rezistentă la alcalii, caracter pe care se bazează şi determinarea ei cantitativă, prin metodă chimică. Această formă are o afinitate mai crescută pentru O_2 decît hemoglobina Hgb A, explicată prin faptul că legătura între Hgb F şi 2,3-DPG se face mai greu. Subunităţile Hgb sînt de dimensiuni similare dar nu identice. Forţele care le leagă nu determină legături covalente. De aceea disocierea subunităţilor Hgb se face uşor şi nu implică un clivaj reductiv, aşa cum este necesar pentru ruperea punţilor S-S (disulfurice) dintre lanţurile uşoare şi grele ale imunoglobulinelor sau haptoglobinelor. În ansamblu, molecula de globulină din hemoglobină cuprinde 574 aminoacizi. Lanţurile α conţin 141 resturi aminoacizi, iar lanţurile β 146, cu secvenţa bine cunoscută (determinată în perioada 1962—1964). Cele patru lanţuri polipeptidice din molecula de hemoglobină sînt legate labil între ele prin punţi de hidrogen sau forţe van der Waals. Studiile de structură conformaţională sau tridimensională, pe bază de spectre de difracţie cu raze X (sinteze Fourier) datorite în special lui Culos şi colab., Perutz 1962—1965, au demonstrat că lanţurile polipeptidice individuale sînt similare lanţului polipeptidic unic al mioglobinei descris de Kendrew şi colab. (1960—1961). Atît lanţul unic al mioglobinei cît şi lanţurile α şi β ale hemoglobinei au opt zone helicoidale*. La hemoglobină, ca la toate proteinele globulare, în zonele de plicaturare sînt prezenţi aminoacizii *„hellix dezorganizatori"* — hidroxiprolina, prolina — sau *hellix destabilizatori* ca: serina, izoleucina, treonina, acidul glutamic, acidul aspartic. Asemănarea este datorată în parte aminoacizilor omologi dar mai ales trăsăturii comune de excludere a resturilor polare din interiorul lanţurilor de globuline. Aproape toate grupările polare laterale ale aminoacizilor sînt dirijate către exterior iar către cavitatea interioară a

* Zonele helicoidale se notează A, B, C, D, E, F, G, H şi sînt despărţite prin 7 segmente nehelicoidale.

moleculei, cele nepolare. Mutaţiile genetice care provoacă înlocuirea aminoacizilor polari prin nepolari la suprafaţa exterioară nu afectează structura terţiară dar înlocuirea unui rest nepolar printr-unul polar în situsul interior — deci realizarea unei constituţii neconservative — distruge integritatea structurală a moleculei (Perutz — 1961). Mutaţiile genetice, punctiforme, pot altera funcţiile hemoglobinei, determinînd formarea hemoglobinelor patologice. În hemul hemoglobinic atomul de Fe^{2+} este situat în centrul unui plan patrulater, în care se găsesc cei patru atomi de N, aparţinînd celor patru nuclee pirolice reunite prin grupări metenice (—CH=) ce închid astfel inelul porfirinic. Inelul tetrapirolic are forma unui disc. Fe^{2+} poate lega şase liganzi; privit în spaţiu, el ocupă punctul central al unui octaedru, în vîrfurile căruia se găsesc cei şase liganzi. Toate cele patru legături între Fe şi azotul pirolic sînt identice, reprezentînd o formă de trecere între legătura ionică şi cea coordinativă din complexe. Diferite grupări chimice se pot lega cu al V-lea şi al VI-lea ligand, spaţial distribuite deasupra sau dedesubtul planului tetrapirolic. Pot fi două molecule de apă sau baze organice azotate ca: piridina, imidazolul, cu producere de hemacrom. Fe este un metal hexacoordinabil. După cum se ştie, legătura ionică se realizează printr-un schimb de electroni, iar legătura covalentă printr-o punere în comun de electroni. Legătura coordinativă constituie un tip particular de legătură covalentă, bazată pe faptul că un atom ce posedă „căsuţe cuantice" libere poate accepta electroni provenind de la alt atom sau altă moleculă. Electronii cedaţi de aceasta şi acceptaţi în „căsuţa cuantică" liberă a atomului primitor sînt grupaţi în dublete de electroni cu spin contrar. Numărul de legături pe care atomul este susceptibil să-l contracteze este exprimat în indicele de coordinaţie care în cazul fierului este egal cu 6. Ionul Fe^{2+} poate să găzduiască în căsuţele electronice libere, sau golite de electroni celibatari (nepereche), 6 dublete electronice.

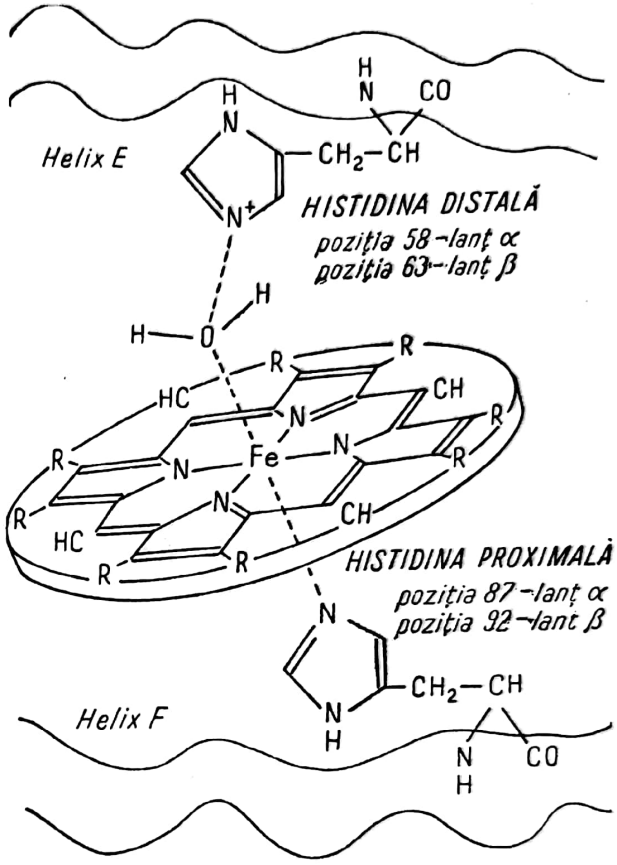


Fig. XIV.9. Legătura dintre atomul Fe şi globină.

În hemoglobina redusă patru legături coordinative ale Fe^{2+} se stabilesc cu azotul celor patru nuclee pirolice iar legăturile a V-a şi a VI-a cu azotul din histidină, în două moduri: direct (a V-a) şi indirect (a VI-a). Legătura directă se face cu un atom de azot dintr-un rest de histidină proximală, His 87 din lanţul alfa şi His 92 din lanţul beta; cea indirectă se face prin intermediul unei molecule de apă, cu un rest histidină distală, His 58 pentru lanţul α şi His 63 pentru lanţul β (fig. XIV. 9). În Hgb-oxigenată legătura VI se face cu O_2.

3.1.11.3. *Biosinteza hemoglobinei.* Biosinteza hemoglobinei presupune elaborarea şi unirea celor două componente: hemul şi globina.

Biosinteza hemului se desfăşoară după cum urmează:

În prima treaptă se formează acid δ-amino-levulinic, produs prin ciclul succinat-glicocol sub acţiunea δ-aminolevulinatsintetazei. Două molecule de acid δ-aminolevulinic se condensează prin acţiunea δ-amino-levulinat-dehidrogenazei cu formarea de porfobilinogen. Urmează transformarea prin dezaminare a 4 molecule de porfobilinogen în porfirină.

Prin decarboxilare şi oxidări succesive se produce protoporfirină. Fierul este introdus în moleculă sub acţiunea hemosintetazei, enzimă mitocondrială deţinătoare de grupări SH. Sinteza hemului are loc în precursorii nucleaţi ai eritrocitului matur (fig. XIV.10).

Pentru sinteza hemului sînt necesari anumiţi factori: acidul tetrahidrofolic, vitamina B_{12}, cupru. *Sinteza lanţurilor peptidice* ale componentei globinice se realizează în eritroblaştii din măduva osoasă şi continuă în eritrocit. Sînt implicaţi doi cromozomi diferiţi, unul pentru lanţul α (141 aminoacizi), celălalt pentru lanţul β (146 aminoacizi). Informaţia genetică din ADN cromosomial este transmisă sub forma a doi acizi ribonucleici mesageri, unicistronali care au o durată de viaţă de cîteva zile. Lanţurile α sînt dovedite produs intermediar şi limitant pentru sinteza globinei. Nu se ştie precis dacă Fe este inclus în complexul globină-porfirină sau dacă globina se uneşte cu hemul. Reacţiile ce se desfăşoară în sinteză sînt redate schematic în fig. XIV.10.

Asocierea celor patru subunităţi fieroporfirină-proteină, se realizează spontan. Natura hemoglobinei ce va fi sintetizată este determinată de specificitatea individuală, de vîrsta sau de condiţia patologică.

3.1.11.4. *Derivaţi ai hemoglobinei.* a) Hemiglobina (methemoglobina) corespunde ca structură hemoglobinei oxidate, cu Fe^{+++} (trivalent) ce nu mai poate exercita funcţia capitală a hemoglobinei, transportul de oxigen. În eritrocitul normal hemiglobina atinge concentraţia 1%, fiind menţinută la acest nivel, în special, prin acţiunea NADH methemoglobinreductazei (NADH diaforazei, după cum s-a arătat). Deficienţa enzimei provoacă methemoglobinemia familială, în cursul căreia methemoglobina intraeritrocitară poate atinge concentraţia de 30%, însoţită de poliglobulie şi modificări hemodinamice. Cianmethemoglobina este un compus ce permite dozarea colorimetrică a hemoglobinei oxidate „in vitro" cu fericianură de potasiu (metodă standardizată internaţională)

b) Carboxihemoglobina. Oxidul de carbon se poate fixa pe molecula de hemoglobină. Afinitatea hemoglobinei faţă de oxidul de carbon este mult mai mare decît aceea faţă de oxigen, fapt care conduce la reducerea substanţială a capacităţii de a transporta oxigen în ţesuturi şi are ca rezultat hipoxia tisulară. Efectul hipoxic este întărit prin acela pe care îl are oxidul de carbon asupra curbei de discociere a oxihemoglobinei, provocînd o deplasare la stînga a acesteia aşa încît liberarea în ţesuturi a oxigenului, pe care îl mai poate transporta, este îngreuiată. Însă, datorită faptului că fixarea oxidului de carbon pe componenta porfirinică a hemoglobinei este reversibilă, oxihemoglobina poate fi refăcută prin ridicarea presiunii oxigenului. Interesantă din acest

Scanned with OKEN Scanner

punct de vedere este aplicaţia terapeutică în intoxicaţii cu oxid de carbon prin terapie cu oxigen, la presiune ridicată. De asemenea, importantă pentru acţiunea de prevenire primară a unor procese degenerative este şi observaţia că

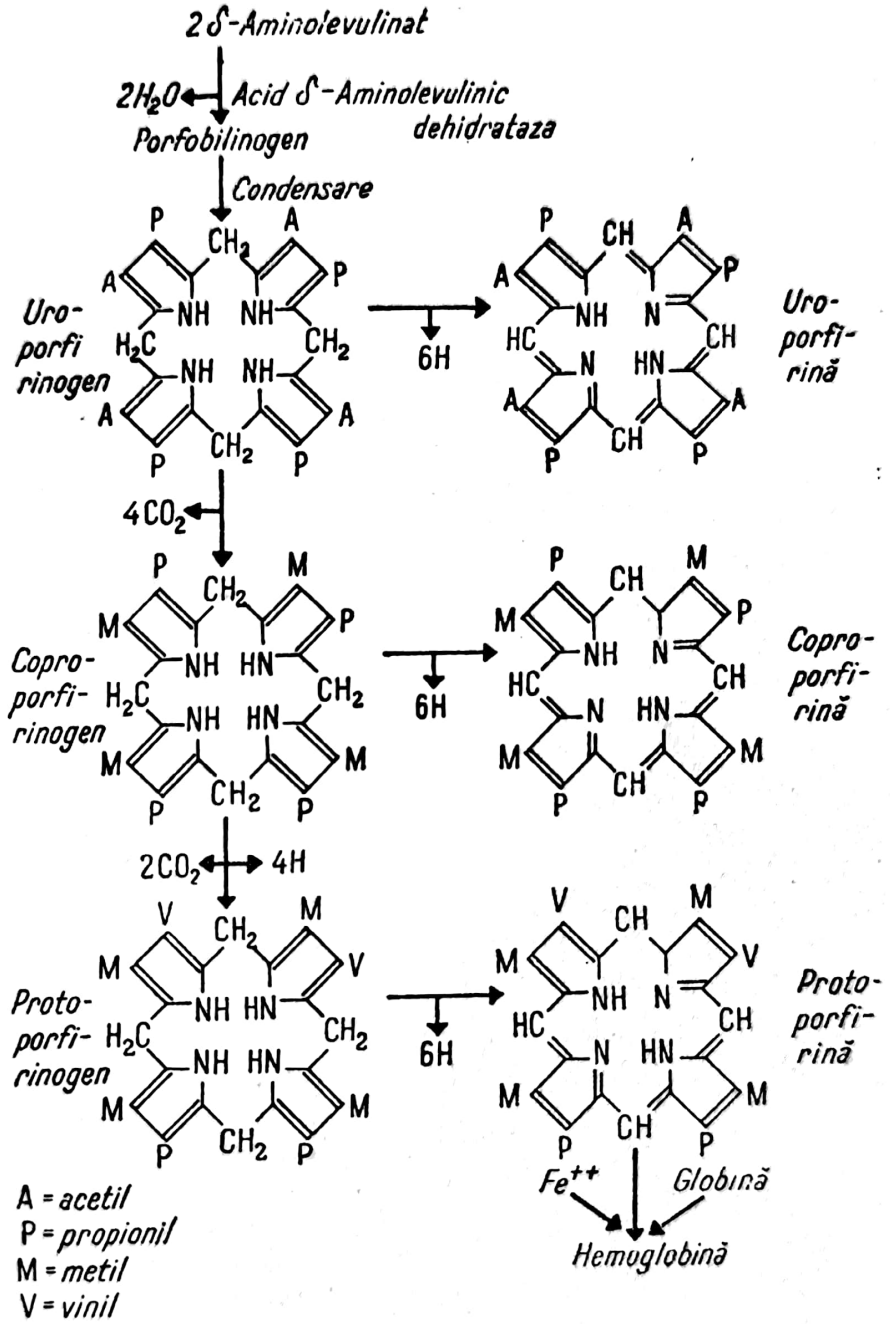


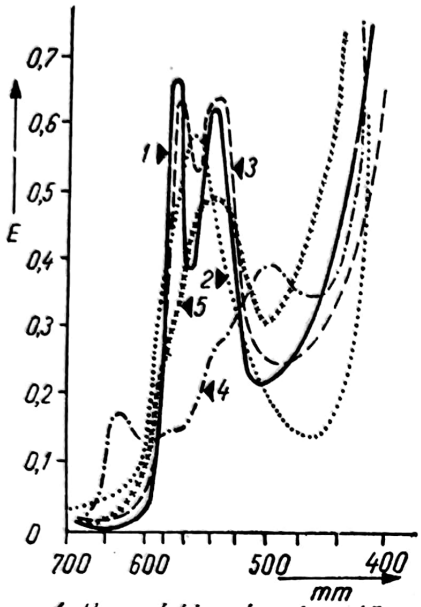
Fig. XIV.10. Biosinteza hemului şi formarea hemoglobinei.

la fumători concentraţia oxidului de carbon în sînge poate determina formarea de carboxihemoglobină, pînă la 10% concentraţie.

3.1.11.5. *Proprietăţile spectrale ale hemoglobinei.* Toate formele de hemoglobină şi derivatele sale prezintă o bandă de absorbţie caracteristică, aşa numita bandă Soret (la 400 nm), determinată de componenta porfirinică. Hemoglobina şi derivaţii săi pot fi diferenţiaţi prin benzile spectrale ce sînt

Scanned with OKEN Scanner

redate în fig. XIV.11. Curba spectrală a carboxihemoglobinei şi aceea a oxihemoglobinei sînt asemănătoare. În practica toxicologică diferenţierea se face prin utilizarea unui reducător (de tipul Na-ditionit) care reduce oxihemoglobina, aducîndu-i curba spectrală la tipul corespunzător hemoglobinei reduse. Curba spectrală a carboxihemoglobinei nu se modifică.



1-Hemoglobina dezoxigenată
2-Carboxihemoglobina
3-Hemoglobina oxigenată
4-Methemoglobina
5-Cianmethemoglobina

Fig. XIV.11. Proprietăţile spectrale ale hemoglobinei şi derivatelor sale.

3.1.11.6. *Funcţia hemoglobinei în transportul de oxigen.* Formarea oxihemoglobinei — la nivelul plămînului — şi disocierea sa în capilarele tisulare asigură transportul oxigenului. Fenomenul poate fi considerat şi înţeles la trei niveluri diferite de interpretare şi anume: fiziologic, molecular şi electronic.

a) *Nivel fiziologic.* Curba care exprimă fixarea oxigenului la mioglobină sau la un lanţ izolat de hemoglobină se prezintă ca un arc de hiperbolă echilateră, fiind asemenea unei curbe Michaelis, corespunzătoare variaţiei vitezei de reacţie enzimatică în funcţie de concentraţia substratului (în cazul unei enzime simple). Însă curba de saturare cu oxigen a hemoglobinei tetramerice, la presiuni parţiale progresiv crescînde ale gazului (la 37° şi pH 7,4), este de tip sigmoidal; alură asemănătoare cu aceea corespunzătoare cineticii enzimelor regulatorii, alosterice, care exprimă desfăşurarea tipică a unui proces cooperativ (fig. XIV.12).

b) *Nivel molecular.* Pe plan molecular s-au făcut interpretări ce pot justifica alura fenomenului de oxigenare a hemoglobinei, care după expresia lui Perutz, funcţionează ca un „plămîn" în formă moleculară, molecula de hemoglobină schimbîndu-şi configuraţia cu fixarea şi liberarea oxigenului. Deşi hemoglobina nu este o enzimă, încă din perioada 1963 s-a arătat că forma sigmoidală a curbei de saturare cu oxigen a hemoglobinei se explică mai bine considerînd hemoglobina ca o enzimă cu proprietăţi alosterice. Combinaţia enzimei cu substratul său, în cazul acesta, a hemoglobinei cu oxigenul — la un anumit situs al moleculei — determină schimbări conformaţionale ce slăbesc legătura enzimei cu substratul la alte situsuri ale moleculei. În sensul arătat de Monod şi colab. (1965), efecte alosterice de acest tip pot fi explicate printr-un

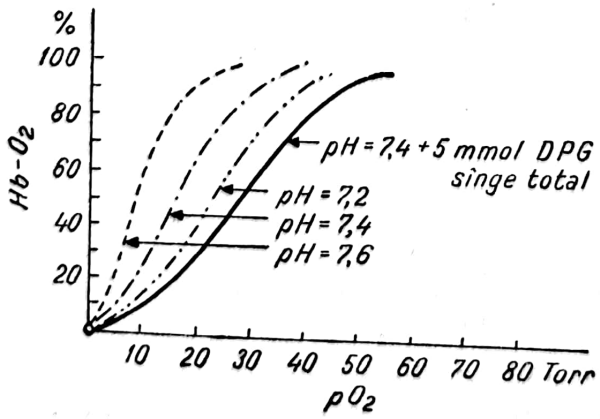


Fig. XIV.12. Curba de saturare a hemoglobinei cu oxigen. Influenţa concentraţiei de H^+ (pH) şi a 2,3-DPG.

model în care proteina are două stări conformaţionale, cu afinitate diferită faţă de substrat (model simetric Monod).

Reacţia de oxigenare a Hgb este:

$$Hgb + 4\,O_2 \rightleftharpoons (HbO_2)_4$$

Curba de saturare cu oxigen a hemoglobinei corespunde unei ecuaţii mai generale a acestui tip, ecuaţia Hill:

$$\frac{HbO_2}{Hb} = K(pO_2)_n,$$

în care n este diferit de 1.

Reacţia globală poate fi privită în cele patru etape succesive ale sale, fiecare avînd constante de echilibru de oxigenare diferite:

$$Hgb \overset{O_2}{\rightleftharpoons} HgbO_2 \overset{O_2}{\rightleftharpoons} HgbO_4 \overset{O_2}{\rightleftharpoons} HgbO_6 \overset{O_2}{\rightleftharpoons} HgbO_8$$

Din interpretarea acestui proces cooperativ s-a ajuns la concluzia că prima moleculă de oxigen se reţine lent pe tetramerul Hgb, a doua şi a treia mai uşor, iar a patra de cîteva sute de ori mai rapid (model secvenţial Koshland). Deci, legarea primei molecule de oxigen accelerează legarea moleculei succesive de gaz, la celelalte trei grupări de hem remanente. După o teorie formulată în intervalul 1964—1966, unitatea funcţională a Hgb nu este tetramerul întreg, ci dimerul α-β, reacţia de echilibru fiind:

$$\alpha\alpha\beta\beta \rightleftharpoons \alpha\beta + \alpha\beta$$

Prin reacţia oxigenului cu hemul primului lanţ α, polipeptidul suferă o modificare conformaţională ce se transmite mecanic sau steric lanţului β de care este legat. În noua sa conformaţie lanţul β are afinitate mai mare pentru oxigen. Legarea primei molecule de oxigen înlesneşte fixarea celei de a doua. Completa oxigenare a primei subunităţi funcţionale şi schimbarea consecutivă a conformaţiei sale creează noi tensiuni interne care determină pe ceilalţi componenţi ai sistemului să-şi schimbe conformaţia, către aceea care are afinitatea mai mare pentru oxigen. În forma oxigenată subunităţile moleculei se pot mişca liber, independent una de alta. Lanţurile β sînt mai apropiate între ele. În forma redusă subunităţile sînt menţinute împreună prin acţiuni electrostatice la care participă aminoacizii carbon-terminali, din cele patru lanţuri peptidice, adică două molecule de histidină şi două de arginină. Aceşti aminoacizi posedă şi grupări încărcate pozitiv; grupul imidazol din histidină şi restul guanidil din arginină. Dacă aceşti patru aminoacizi se desprind, dispare alura sigmoidală a curbei de saturare cu oxigen a hemoglobinei. Deci ei sînt participanţi la efectul cooperativ exprimat în alura sigmoidală a curbei. Se stabilesc acţiuni electrostatice între:

— *restul de arginină* din lanţul α (grupul carboxil încărcat negativ şi restul guadinil încărcat pozitiv), cu două grupări polare din lanţurile α situate în faţa lor; anume grupări NH_2 din aminoacizii aminoterminali (valina) şi grupările negative carboxil ale unui rest aspartat;

— *restul de histidină* din lanţurile β (grupările carboxil negative şi restul imidazol pozitiv) cu un grup polar anume ε-amino din lizină dintr-un lanţ α învecinat. Între cele două lanţuri β nu este o legătură directă. O legătură indirectă se stabileşte prin 2,3-difosfoglicerat în Hgb dezoxigenată.

Scanned with OKEN Scanner

În cele patru lanţuri tirozina este penultimul aminoacid din capătul carbon terminal, înaintea argininei sau histidinei. În forma redusă a hemoglobinei, tirozina este aşezată între două porţiuni helicoidale, prin interacţiunile hidrofobe ale inelului său benzenic cu lanţul peptidic şi prin punţile de hidrogen ce se stabilesc între gruparea sa OH şi gruparea carbonil a unei legături peptidice vecine. Dintre schimbările complexe, care au loc în interiorul moleculei în cursul fenomenului de oxigenare şi dezoxigenare a Hgb, unele sînt de o deosebită importanţă pentru realizarea efectului final. Dintre acestea, poate fi reţinută mişcarea atomului de Fe în planul inelului porfirinic care determină o mişcare a componentei globinice. Ca urmare se îngustează spaţiul în care este fixată tirozina şi astfel este împinsă în afară. Se produce ruptura legăturilor electrostatice cu aminoacizii carbon terminali, histidina şi arginina, precum şi liberarea de protoni.

c) *Nivel electronic.* Legătura atomului de oxigen cu ionul Fe^{++} din prima subunitate funcţională (primul lanţ α_1 din aceasta) produce o modificare a configuraţiei electronice în atomul de Fe. Într-adevăr, atomul de Fe posedă 24 electroni, dintre care 18 corespund configuraţiei gazului nobil argon. El are patru electroni neîmperecheaţi care-i conferă proprietăţi paramagnetice (de a fi atras de un cîmp magnetic). Complexul oxihemoglobinic nemaiavînd electroni neîmperecheaţi devine diamagnetic (deci nu poate fi atras de un cîmp magnetic). În oxihemoglobină legarea celor şase liganzi se face covalent, adică fiecare ligand

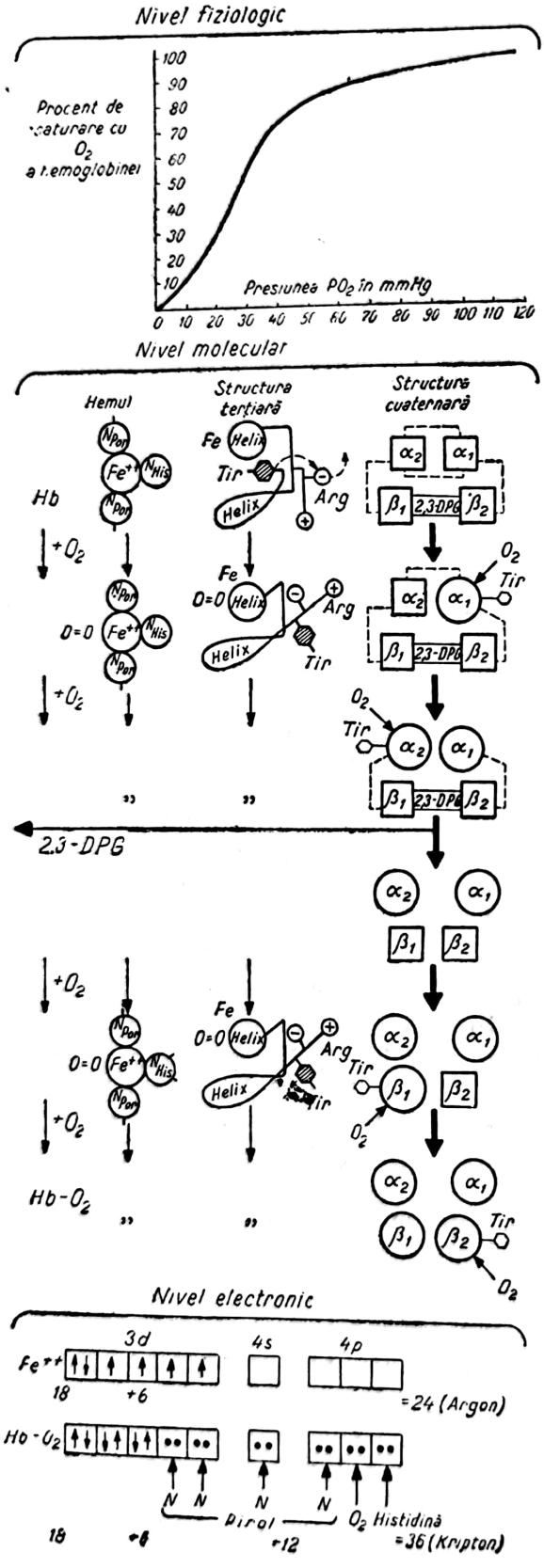


Fig. XIV.13. Oxigenarea hemoglobinei: a) *Nivel fiziologic:* curba de saturare cu O_2 a hemoglobinei. b) *Nivel molecular:* schimbările conformaţionale, ruperea legăturilor electrostatice cu aminoacizii C terminali, deplasarea tirozinei, liberarea de protoni, apropierea lanţurilor. c) *Nivel electronic:* schimbarea configuraţiei electronice a Fe++ cu pierderea proprietăţilor paramagnetice.

pune în comun o pereche de electroni aşa încît Fe legat covalent realizează (un total de 36 de electroni, ce reprezintă configuraţia gazului nobil kripton. În fig. XIV.13 sînt redate toate transformările descrise pînă în prezent la nivel fiziologic, molecular şi electronic al fenomenului de oxigenare a hemoglobinei. Schimbările de configuraţie a moleculelor de hemoglobină determină micşorarea distanţei dintre cele două lanţuri β (proces care a fost deja menţionat).

3.1.11.7. *Interacţiunea reglatorie dintre 2,3-DPG şi Hgb.* Afinitatea hemoglobinei pentru oxigen este dependentă nu numai de factorii de structură moleculară şi configuraţie electronică descrişi ci, în bună parte, de concentraţia anumitor compuşi organici fosforici ca ATP şi în special 2,3-DPG. În eritrocitele umane, acest ultim compus are aceeaşi concentraţie moleculară ca Hgb, reprezentînd de cca 4 ori concentraţia molară a ATP. Aşa cum s-a menţionat deja, prin fixarea de 2,3-DPG pe molecula de Hgb scade afinitatea acesteia pentru oxigen. Această acţiune constituie un mecanism prin care eritrocitul îşi reglează activitatea şi funcţia de transport a oxigenului, asigurînd alimentarea ţesuturilor cu acest gaz, în condiţii exterioare defavorabile ca, de exemplu, altitudine ridicată sau scăderea numărului de eritrocite circulante. În hipoxie pH-ul eritrocitar joacă un rol important în reglarea nivelului de 2,3-DPG. Lipsa de oxigen duce la hiperventilaţie cu eliminare crescută de CO_2 ceea ce are drept urmare starea de alcaloză, cu creşterea pH-ului intraeritrocitar. Concomitent se produc: scăderea concentraţiei DPG liber, prin legarea acestuia cu dezoxihemoglobina. Alcalinizarea intraeritrocitară duce la o creştere a ratei glicolitice preponderent prin acţiunea fosfofructokinazei (PFK) care conduce la ridicarea concentraţiei de 2,3-DPG. Deoarece 2,3-DPG-fosfataza este inhibată prin creşterea pH-ului, această modificare constituie încă un factor de creştere a rezervei de 2,3-DPG în hipoxie (fig. XIV.14). Creşterea concentraţiei de 2,3-DPG, ce nu trece prin membrana eritrocitară, ca şi scăderea pH-ului intracelular determină schimbări ionice prin echilibrul de membrană Donnan. Rata de sinteză a 2,3-DPG revine la normal. Variaţiile de pH

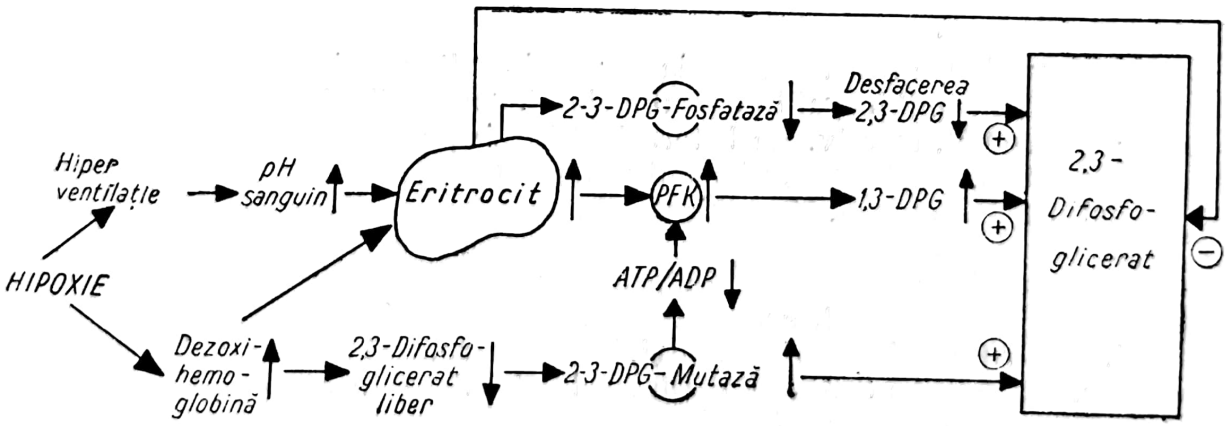


Fig. XIV.14. Inducţia prin hipoxie a creşterii 2,3-DGP eritrocitar.

eritrocitar influenţează totodată şi afinitatea pentru oxigen a hemoglobinei (efectul Bohr). Creşterea pH-ului intraeritrocitar deplasează curba de saturare la stînga. Creşterea concomitentă a concentraţie 2,3-DPG determină însă o deplasare a curbei de saturare spre dreapta.

Scanned with OKEN Scanner

3.1.11.8. *Funcţia hemoglobinei în transporul de CO_2.* Hemoglobina poate transporta CO_2, datorită legăturii chimice a gazului cu unii aminoacizi (foarte probabil cu resturile amino ale valinei terminale). Aproximativ 20% din CO_2 transportat de sînge este legat sub forma de compus carbaminic. Reacţia are loc neenzimatic, conform ecuaţiei:

$$R-NH_2+CO_2 \rightleftharpoons R-NH-COO_3^- + H^+$$

Cea mai mare parte a bioxidului de carbon difuzat în eritrocite este transformat ireversibil sub acţiunea anhidrazei carbonice:

$$CO_2+H_2O \underset{}{\overset{\text{anh. carb.}}{\rightleftharpoons}} H_2CO_3$$

Acidul carbonic produs se disociază în ion bicarbonic cu protoni. Protonii liberaţi sînt luaţi de hemoglobină, iar ionii bicarbonici difuzează în plasmă. Bicarbonaţii reprezintă forma principală de transport (70%) a CO_2 din ţesuturi către plămîn. Funcţia hemoglobinei în sistemul tampon de reglare a echilibrului acido-bazic al sîngelui sînt prezentate în capitolul II.

3.1.11.9. *Hemoglobine patologice.* Acestea sînt cunoscute sub forma a mai mult de 150 variante, cu abateri ale structurii primare a hemoglobinei, frecvenţa anomaliilor fiind de circa 1/600. Mecanismul de producere a lor este complex:

— *Prin substituirea unuia sau mai multor resturi de aminoacizi din anumite poziţii.* În aceste cazuri schimbarea trebuie să fie neconservativă, adică un acid polar să fie substituit printr-unul apolar şi reciproc, cum este cazul înlocuirii acidului glutamic (hidrofil) cu valina (hidrofobă) din lanţul β al hemoglobinei. Condiţia este necesară dar nu şi suficientă. Este hotărîtoare localizarea aminoacidului la suprafaţă sau în interiorul moleculei de hemoglobină. Anomaliile se produc numai prin substituirea neconservativă a aminoacizilor din interiorul moleculei, unde se află scheletul porfirinic al hemului şi unde se face legătura cu oxigenul. Schimbarea aminoacizilor polari prin aminoacizi nepolari, la suprafaţa externă a moleculei, nu afectează structura terţiară şi proprietăţile hemoglobinei. Acest mecanism acţionează ca urmare a „mutaţiei punctiforme".

— *Prin deleţie* sau lipsa unuia sau mai multor aminoacizi, ca urmare a unui „crossing-over" inegal în cursul meiozei. Anomaliile hemoglobinei se moştenesc autosomal, recesiv. La heterozigoţii care posedă hemoglobină normală şi patologică în părţi egale, pigmentul normal este suficient pentru alimentarea ţesuturilor cu oxigen. Homozigoţii prezintă însă anemii ale căror consecinţe sînt severe, provocînd adesea moartea. Desemnarea anomaliilor se face fie prin litere mari ale alfabetului, fie prin denumirea clinicii, locului sau numele pacientului — unde sau la care — s-a făcut pentru prima oară descrierea anomaliei. Pentru exprimarea exactă şi în formă concisă a anomaliilor lanţului peptidic, se indică poziţia şi natura schimbării ca în exemplul — cel mai bine cunoscut — din anemia „sickle-cell" (cu eritrocite în formă de seceră): $\alpha_2\beta_2$-6-glu-val.

Formula arată că în poziţia 6 a lanţului β din molecula de Hgb$\alpha_2\beta_2$ restul aminoacidic glutamil este înlocuit cu valil. Anomaliile structurale ale moleculei de hemoglobină patologică se reflectă în modificarea proprietăţilor fizico-chimice ale formei moleculare ce stau la baza metodologiei de depistare şi caracterizare a hemoglobinelor patologice. Modificările privesc sarcina electro-

nică, solubilitatea, stabilitatea moleculei, afinitatea pentru oxigen, spectrul de absorbție. Metodele se aplică pe eritrocite sau soluții de hemoglobină obținută prin citoliză.

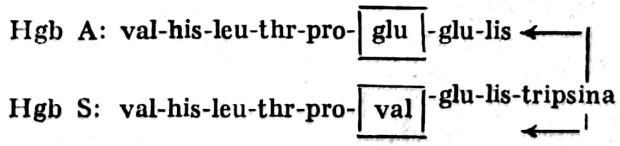
Hemoglobinopatiile se împart în două categorii: a) *calitative* în care anomalia genetică determină structura chimică anormală a moleculei de hemoglobină și b) *cantitative* în care anomalia privește doar rata de sinteză a unuia sau mai multor lanțuri polipeptidice dintre care unele sînt prezente în structura normală.

a) *Anomalii calitative.* În această grupă sînt incluse cîteva tipuri de anomalii genetice ale secvenței aminoacizilor din hemoglobină, selectate dintre cele 150 variante cunoscute și redate după cum urmează:

Denumirea anomaliei	*Poziția substituției*	*Substituția*
Iwate	α-87	His—tir
Boston	α-58	His—tir
Hyde-Park	β-92	His—tir
Saskatoon	β-63	His—tir
Milwaukee	β-67	Val—Glu

Toate aceste variante sînt asociate cu methemoglobinemie.

În fig. XIV.15 sînt subliniate pozițiile din lanțul β în care substituțiile neconservative aminoacidice determină alterări ale funcției hemoglobinei. Sînt semnalate anemia falciformă sau drepanocitoza cu hematii în formă de seceră cu hemoglobina S, rară în Europa, răspîndită însă în Africa, America de Sud și Centrală, la populațiile de culoare. Este caracterizată prin sînge sărac în oxigen, eritrocite în formă de seceră, predispoziție la hemoliză. După cum s-a mai menționat, baza moleculară a bolii este schimbarea restului glutamil prin vanil, în poziția a VI-a din lanțul β. Schimbările pot fi puse în evidență prin: metode electroforetice, electrocromatografice, cu ajutorul așa numitei *metode a amprentelor* (Finger-Printing) a lui Ingram. Hemoglobina este hidrolizată prin tratare cu tripsină. Prin comparația frontului de migrare a peptidelor triptice de la normal și de la purtătorii de anomalii hemoglobinică — se observă schimbarea vitezei de migrare a unui anumit fragment peptidic. Analiza spotului a arătat că este vorba de un octopeptid, din lanțul β, care diferă de cel normal prin substituție de tip neconservativ — deja menționată — valil în locul restului glutamil:



Peptidul se rupe la nivelul unei legături la care participă lizina. Schimbarea unui acid hidrofil printr-unul hidrofob (valina) are ca urmare schimbarea mobilității electroforetice, cu orientare net catodală. Capacitatea de saturare cu O_2 a Hgb nu este însă modificată, deoarece defectul de structură moleculară este localizat la suprafața moleculei de Hgb. Particularitatea morfologică, caracteristică (forma „în seceră" a eritrocitului), are drept cauză, la nivel molecular, agregarea moleculelor de HgbS. O ipoteză care încearcă să explice cauza moleculară a agregării este următoarea: liberarea oxigenului produce o modificare conformațională a moleculei de hemoglobină. La suprafața sa apar două zone hidrofobe cu valină. Prin interacțiune hidrofobă, HgbS s-ar

comporta ca un anticorp bivalent, care acţionează cu o altă moleculă de Hgb, ca şi cum acesta ar fi un antigen. În scop terapeutic se încearcă experimental — acetilarea medicamentoasă a zonei hidrofobe pentru a împiedica interacţiile

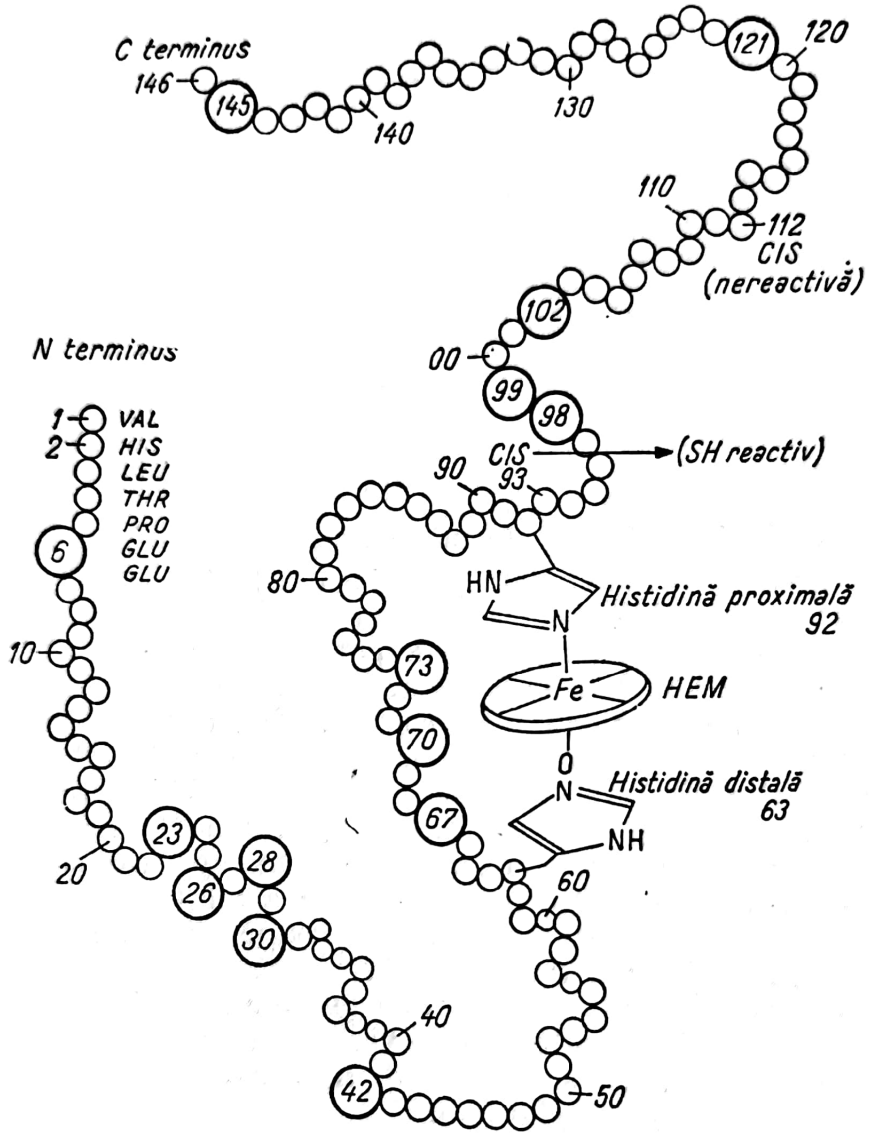


Fig. XIV. 15. Schema structurală a unui lanţ β în care substituirile neconservative ale aminoacizilor determină anomalii ale hemoglobinei (adaptat după H. Giblett).

hidrofobe care duc la agregarea Hgb cu urmările sale: drepanocitoza, hemoliza şi anemia severă.

Hemoglobinopatii cu methemoglobinemie. După cum s-a arătat, pentru stabilizarea fierului din hem în forma bivalentă este important ca în lanţurile α poziţiile 58 şi 87, iar în lanţurile β poziţiile 63 şi 92 să fie ocupate de histidină. Înlocuirea acesteia cu tirozina aduce pierderea capacităţii de stabilizare a ionului de Fe, în forma bivalentă, Fe^{2+}, exercitată de nucleul imidazolic al histidinei, prin cei doi electroni ai atomului de N, inclus în heterociclul respectiv. Ionul de Fe devine astfel trivalent, Fe^{3+}, iar hemoglobina se transformă în methemoglobină. În fig. XIV.16 sînt redate substituţiile histidinei cu tirozină, pentru patru din tipurile de anomalii cunoscute.

Scanned with OKEN Scanner

Hemoglobina H (Hammersmith) este caracterizată prin înlocuirea unui rest hidrofob de fenilalanină din interiorul moleculei de hemoglobină printr-un rest hidrofil de serină. Aceasta determină, prin intrarea apei, o perturbare a in-

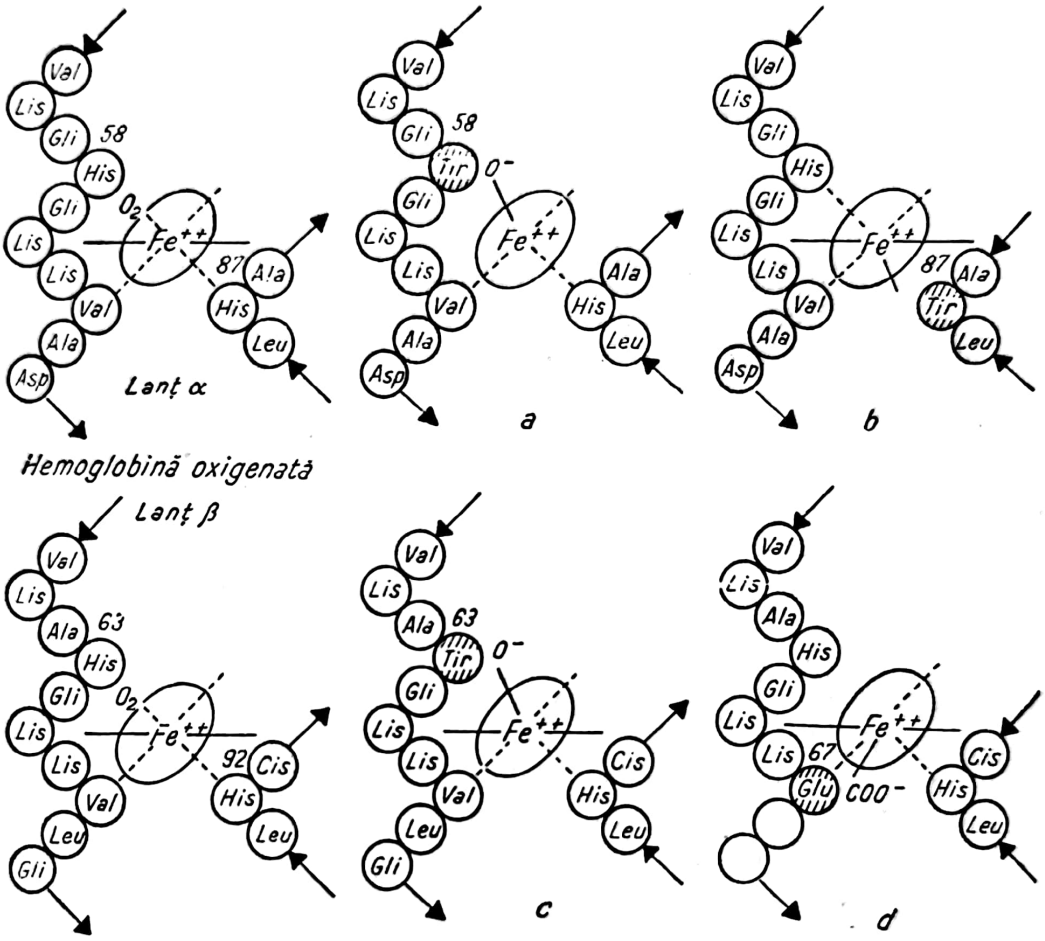


Fig. XIV.16. Anomalii determinate prin substituțiile histidinei cu tirozina:
a) HgbM Boston, b) HgbM Iwate, c) HgbM Saskatoon, d) HgbM Milwaukee.

teracțiilor hidrofobe dintre globină și hem și, ca urmare, desprinderea hemului de moleculă.

b) *Hemoglobinopatii cantitative.* Dintre acestea, talasemiile* (sindroame talasemice) sînt caracterizate la nivel molecular prin încetinirea biosintezei unuia din cele două tipuri de lanțuri ale Hgb, în eritroblaștii măduvei osoase. Anomalia și boala consecutivă există mai ales în bazinul mediteranean, motiv pentru care boala mai poartă și numele de anemie mediteraneană. În forma homozigotă — talasemia major (anemia Cooley), cu celule în „țintă" — anomalia duce la moarte în copilărie, datorită incapacității de oxigenare a țesuturilor. În forma heterozigotă — talasemia minor — anomalia este compatibilă cu viața. În α-talasemie este încetinită biosinteza lanțului α, cu restrîngerea producerii celor trei forme de hemoglobină normal prezente în eritrocit (hemoglobina A, A_2 și F). La embrion odată cu încetinirea biosintezei lanțurilor α se produce și un exces de lanțuri γ. Se produce tetramerul γ_4 sau hemoglobina Bart. După naștere lanțurile γ pot fi înlocuite cu lanțuri β și cu formare de

* Denumirea derivă din cuvîntul grecesc thalasso = mare.

tetrameri β_4 (Hgb H). Cele două forme Bart și H sînt instabile; predispun la deformări eritrocitare și anemii hemolitice. β-talasemia se manifestă în cîteva săptămîni sau luni după naștere. Caracteristica biochimică este biosinteza lentă a lanțului β. Se produce un exces relativ în lanțuri α, γ sau δ împreună. La heterozigoți Hgb A_2 ($\alpha_2\delta_2$) ajunge 4—6% (normal 2—3%) iar Hgb F ($\alpha_2\gamma_2$) 0,5—6% (normal absent). Nu se formează tetrameri α_4. La homozigoți conținutul de hemoglobină F în eritrocit variază între 50 și 100%, fapt care explică urmările letale ale anomaliei.

3.2. LEUCOCITELE

Împreună cu precursorii lor din măduva osoasă, leucocitele alcătuiesc seria mielocitară. Populația leucocitară din sîngele periferic este alcătuită din granulocite neutrofile, eozinofile, bazofile, limfocite și monocite. Limfocitul este socotit mai degrabă o celulă tisulară, din țesutul limfoid, deoarece numai 1% din populația limfocitară circulă în sîngele periferic. Din acest motiv, datele referitoare la limfocite sînt prezentate odată cu biochimia răspunsului imun.

3.2.1. GRANULOCITELE

Se împart după natura și tinctorialitatea granulației lor specifice, în: neutrofile, eozinofile și bazofile. Datele electronomicroscopice (1975) arată că aceste granulații secundare — în raport cu cele primare azurofile, din celulele precursoare (promielocit, mielocit) — se formează pe fața convexă a aparatului Golgi. Fiecare categorie are caractere fizico-chimice proprii. Granulațiile neutrofile conțin proteine bazice, peroxidaze, hidrolaze de tipul fosfatazei alcaline, β-glucuronidaze, peptidaze, aminopeptidaze ca de exemplu leucin-amino-peptidaza (LAP), colagenază și mai ales lizozim (muramidază). Din cantitatea totală de lizozim a neutrofilelor, circa 2/3 se găsește în granulațiile specifice. Granulațiile eozinofile sînt înconjurate de o membrană și conțin un corp dens de fosfolipide, dispus în axul mare al granulației. Se mai găsesc de asemenea, hidrolaze dintre care aril-sulfatazele sînt foarte active, peroxidaze de două tipuri (Archer), ce se pot studia bine în produsele de degranulare. Peroxidazele se găsesc în cantitate mai mare decît în granulațiile neutrofile, dar eozinofilele nu conțin lizozim și fagocitină. Bogăția în arginină a proteinelor euzinofilului justifică bazicitatea care conferă celulei eozinofilia. Granulațiile bazofile conțin cantități mari de heparină și histamină care determină marea afinitate pentru coloranții bazici.

Granulocitele neutrofile, denumite și polimorfonucleare, joacă rolul cheie în procesul de apărare împotriva bacteriilor pe care le distrug prin fagocitoză și bactericidie.

3.2.1.1. *Reglarea granulopoiezei*. Numărul leucocitelor fiziologic circulante este foarte mic în raport cu acela al granulocitelor medulare (de circa 24 de ori mai mare). Granulocitele din sîngele periferic sînt în număr de $0,7 \times 10^9$ celule pe kg corp, repartizate în două sectoare de mărime inegală: circulator și marginale, adică aderente de peretele venulelor, înainte de a trece în țesuturi. În reglarea granulopoiezei medulare intervin cîțiva factori a căror natură chimică este necunoscută sau parțial înțeleasă, pentru unii dintre ei. Astfel,

Scanned with OKEN Scanner

se menţionează existenţa unui factor „inductor al leucocitozei" a cărui natură nu este precizată, care acţionează asupra vaselor şi sinusoidelor medulare, favorizînd trecerea în circulaţia periferică a unor neutrofile, încă nematurate. În sînge s-a pus în evidenţă (1973) existenţa a doi factori antagonişti între ei: *chalona*, polipeptid cu greutate moleculară de 5 000 daltoni, inhibitor al proliferării granulocitare şi *antichalona* cu greutate moleculară de 30 000 daltoni, stimulator al leucocitului. La nivelul celulelor de origine granulopoietică acţionează, ca factor stimulator, granulopoietina. În culturi de celule pe agar este semnalat un factor stimulator al coloniilor celulare (FSC). Acesta este o glicoproteină cu greutate moleculară 45 000—100 000 secretată — se pare — de monocite şi macrofoge.

3.2.1.2. *Metabolismul granulocitului. Catactere generale.* Studiile biochimice şi enzimatice asupra populaţiei granulocitare au început în 1951, prin lucrările lui Valentine şi s-au continuat pînă în prezent, cu rezultate mai mult sau mai puţin concludente. În general, au fost folosite trei căi pentru studiul capacităţilor metabolice şi enzimatice ale leucocitelor:

a) evaluarea proceselor metabolice globale: respiraţie, glicoliză anaerobă, capacitate reductivă, capacitate proteolitică;

b) investigaţia unor sisteme enzimatice implicate în procesele de sinteză pentru acizi nucleici, acid tetrahidrofolic, glicogen, grăsimi;

c) investigaţia izolată a uneia sau mai multor enzime din variatele căi metabolice.

Ca modalităţi tehnice s-au folosit două căi de abordare a problemelor (Vergnes): a) tehnicile topochimice sau citoenzimologice, indirecte, calitative, ce permit localizarea activităţii enzimatice în celula intactă; b) tehnicile „directe" care permit evaluarea cantitativă în omogenate sau citolizate a activităţilor enzimatice, avînd proteina enzimatică în soluţie. Datele sînt uneori contradictorii, în special cu privire la procesele energetice fundamentale, glicoliză şi respiraţie. Din majoritatra studiilor se desprinde totuşi concluzia că profilul energetic al granulocitului este de tip glicolitic anaerob, în timp ce al limfocitului, celulă multipotentă funcţional, este de tip oxidativ, aerob. Zimogramele LDH granulocitare sînt de tip catodal (aşa cum se obţin din ţesuturile cu intensă glicoliză anaerobă)*. Calea glicolitică anaerobă a fost bine explorată în granulocit. Activitatea glicolitică a granulocitelor este însă dependentă de mediul de incubaţie, de originea şi modul de preparare a suspensiei leucocitare, resuspendarea lor în ser sau plasmă, sau într-un mediu salin artificial. Aceste fapte explică rezultatele variabile şi adesea contradictorii ca acelea privind existenţa glicolizei aerobe, care ar da granulocitului normal caracter de celulă tumorală. Informaţii mai puţin precise se referă la calea şuntului pentozic, ciclul acizilor tricarboxilici şi fosforilarea oxidativă. Producerea de ATP nu a putut fi studiată bine decît la nivel de glicoliză anaerobă leucocitară. Probe mai ales indirecte şi foarte puţine directe permit să se afirme existenţa fosforilării oxidative, respiratorii, în granulocite. Acestea sînt:

— prezenţa efectului Pasteur şi al efectului Crabtree (capitolul IX), adică a competiţiei între sistemul glicolitic şi a oxidării fosforilante pentru ADP;

---

* Zimogramele limfocitare sînt în general de tip anodal ca în ţesuturile cu fosforilare oxidativă intensă, deşi uneori s-a obţinut şi model de tip catodal. Heterogenitatea modelelor poate fi legată de multiplicitatea funcţională a celulei.

Scanned with OKEN Scanner

— prezența mitocondriilor cu creste bine definite;

— acțiunea inhibitorilor sistemului de transport electronic (CN^-, N_3Na) și a agenților decuplanți ai fosforilării oxidative (DNP) asupra încorporării de fosfor P^{32};

— existența unei slabe fosforilări oxidative în preparatele de mitocondrii leucocitare normale. După unii cercetători, fenomenul este posibil numai în prezență de succinat, malat sau 3-glicerofosfat. Alte experiențe dovedesc că substraturile cele mai indicate în acest caz sînt succinatul și α-glicerofosfatul. După altă grupă de cercetători, fosforilarea oxidativă nu este posibilă decît în celulele leucozice (cu caractere de celule nematurate);

— numai inhibitorii glicolizei anaerobe (Sbarra și colab., 1972) scad puterea fagocitară a polinuclearului în timp ce inhibitorii respirației și agenții decuplanți ai fosforilării oxidative sînt fără efect asupra acesteia.

Deviații metabolice energetice marcate se observă în cursul hemopatiilor maligne ale seriei albe (mieloleucoze acute și cronice, în special acutizate). Interpretarea rezultatelor pune probleme de heterogenitate a celulelor albe și probleme cu privire la natura procesului poliferativ sau cumulativ. S-ar părea că procesul leucozic reprezintă o acumulare de celule nematurate, încărcate în mod neregulat cu elemente de celulă matură.

Evoluția metabolismului granulocitar în cursul maturării. În măduva osoasă, de la promieloblast către granulocit, celula trece în linii mari prin două faze. *În prima fază* procesele energetice atît cele oxidative fosforilante, cît și cele glicolitice, sînt preponderente față de cele hidrolazice (fosfataza alcalină, proteaza, esteraze nespecifice, lizozim). Glicogenul și enzimele implicate în metabolismul său sînt reduse iar peroxidazele caracteristice seriei mielocitare lipsesc. *În faza a II-a,* odată cu apariția granulațiilor specifice, se produc și mieloperoxidaze, hidrolazele ajung la prevalență față de enzimele energetice, în special a celor legate de aparatul mitocondrial care se reduc aproape pînă la dispariție, deși după unii autori succin dehidrogenaza este prezentă și în granulocitul matur. Depozitele de glicogen cresc, glicoliza anaerobă devine preponderentă energetic iar șuntul pentozic este activ.

3.2.1.3. *Funcțiile granulocitului neutrofil.* Acesta exercită două funcții dintre care una majoră — *fagocitoza* — se încadrează în mecanismele de apărare împotriva infecțiilor, iar cealaltă de mai mică amploare este cea secretorie. Granulocitul neutrofil secretă o α_2-globulină care fixează și transportă vitamina B_{12} — transcobalamina I. Nivelul de concentrație serică al acestei α_2 globuline este proporțional cu masa totală a granulocitelor.

A. *Fagocitoza* este un proces complex în a cărei dinamică se deosebesc trei etape: *leucotaxia, fagocitoza* propriu-zisă sau ingestia germenilor microbieni, sau a particulei străine și *bactericidia*, sau distrugerea germenilor. În desfășurarea acestor procese intervin atît factori extracelulari cît și intracelulari. Leucotaxia — fenomen de chemotaxie — adică atracția și mișcarea neutrofilului către particula sau microbul de fagocitat, se realizează printr-un mecanism incomplet cunoscut. Se consideră că fenomenul ar fi legat de capacitatea leucocitului de a recunoaște „non-selful" și „selful" alterat. Activitatea chemotaxică se manifestă în primul rînd prin activarea sistemului complement seric (în special, componenta C_3), prin microorganisme, produse bacteriene și complexe antigen-anticorp. Dintre ceilalți factori chemotoxici pot fi menționați: produse ale degradării colagenului și fibrinei, enzime ale coagulării

Scanned with OKEN Scanner

și fibrinolizei (activatorul plasminogenului), mediatori ai inflamației (calicreina), complexul trimolecular $C_{5, 6, 7}$ activat.

Opsoninele, dintre care mai importante sînt IgG și C_3 activat, leagă receptorii pentru IgG și C de pe suprafața bacteriei și a neutrofilului realizînd un fel de punți de legătură.

Fagocitoza este un proces energetic întreținut prin glicoliza anaerobă, după cum s-a mai spus. În urma contactului cu corpul străin — particulă sau microb — granulocitul emite pseudopode care înconjură și apoi include în corpul său elementul străin. Se formează o vacuolă de fagocitoză sau fagosomi, în care este cuprinsă bacteria. Concomitent, se produce o creștere a activității proceselor generatoare de ATP. Fagocitoza poate fi oprită prin inhibitorii metabolici ai glicolizei anaerobe (acid monoiodacetic). Granulațiile specifice ale neutrofilului fuzionează cu fagosomul, fenomenul manifestîndu-se ca degranulare iar enzimele de tipul hidrolazelor și lizozimului în special se revarsă și distrug peretele bacterian (șoc osmotic) fără a ajunge însă în citosol.

B. *Bactericidia.* Metabolismul oxidativ asociat cu bactericidia, prin care se finalizează procesul de fagocitoză îndeplinit de polimorfonucleare și macrofage, este caracterizat prin trei trăsături esențiale:

— creșterea consumului de oxigen;

— stimularea șuntului pentozic în degradarea oxidativă a glucozei pe această cale;

— producerea de apă oxigenată, de anioni superoxid (O_2^-) și în mai mică măsură $^1O_2$ (singlet) — după Allen, 1972 — forme cu nivel energetic ridicat ale oxigenului.

După Karnovschi (1962), consumul de oxigen crescut și producerea de apă oxigenată ar proveni și din oxidarea NADH (generat în glicoliza anaerobă) prin acțiunea NADH-oxidazei (flavinenzimă).

Legătura între cele două sisteme NADPH-oxidază și NADH-oxidază se stabilește prin reacții auxiliare, dintre care foarte importantă ar fi activitatea transhidrogenazei.

Deoarece enzimele șuntului pentozic nu-și schimbă proprietățile în cursul fagocitozei, s-a sugerat existența unui sistem oxidativ, a cărui activare să justifice creșterea consumului de oxigen O_2 și producerea unui factor stimulator al șuntului. Acesta este NADP, factor limitant al ratei șuntului pentozic ce s-ar produce principal prin acțiunea NADPH-oxidazei (flavinenzimă).

Din ansamblul posibilităților se pot lua în considerație unele mecanisme de reacție, ce pot justifica cele trei trăsături metabolice esențiale ale bactericidiei. Aceste posibilități sînt exprimate în mecanismele de reacție redate mai jos.

a) *Activarea NADPH-oxidazei:*

$$NADPH_2 + O_2 \xleftrightarrow[\text{NADPH-oxidază}]{} NADP + H_2O_2$$

b) *Activarea NADH-oxidazei;*

$$NADH_2 + O_2 \xleftrightarrow[\text{NADH-oxidază}]{} NAD + H_2O_2$$

c) *Activarea transhidrogenazei:*

$$NAD + NADH \xleftrightarrow[\text{transhidrogenază}]{} NADH + NADP$$

Scanned with OKEN Scanner

d) Corelarea cu activitatea enzimelor implicate în sistemul glutation oxidat — glutation redus:

$$2H_2O_2 + GSH \xleftrightarrow[\text{glutation peroxidază}]{} 2H_2O + 2G-S-S-G;$$

$$G-S-S-G- + NADPH_2 \xleftrightarrow[\text{glutation reductază}]{} 2G-SH + NADP;$$

e) Producerea de H_2O_2 din anionul superoxid în soluţii apoase sau prin reducerea acestuia:

$$O_2^- + 2\,H_2O \longleftrightarrow 2\,H_2O_2, \text{ sau}$$

$$O_2^- + O_2^- + 2\,H^+ \longleftrightarrow H_2O_2 + O_2$$

f) Producerea de oxigen $^1O_2$ s-ar face fie prin dismutarea anionului superoxid (nedovedită în leucocit), fie prin reacţia dintre H_2O_2, halide şi mieloperoxidază. Anionul superoxid poate reacţiona cu apa oxigenată preformată, pentru a da naştere la radicalii liberi (OH°) care pot provoca peroxidarea lipidelor nesaturate din membranele microbiene. Nu se ştie încă sigur, dacă granulocitul conţine superoxid-dismutază, pentru anihilarea efectelor toxice ale anionului superoxid şi eventual, a oxigenului $^1O_2$. O parte din H_2O_2 este folosită direct în bactericidie iar o alta poate fi descompusă prin catalază din peroxisomii leucocitari sau antrenată — după cum s-a arătat mai înainte — în sistemul de echilibrare a glutationului, oxidat-redus. Prin fuziunea unui fagosom ce conţine o bacterie cu un peroxisom, se poate produce H_2O_2, datorită acţiunii unei D-aminoacid oxidaze bacteriene. Acţiunea bactericidă a H_2O_2 în fagosomi poate fi mărită prin prezenţa halidelor (cu I, Br sau Cl), cu formarea unui complex activ: MPO (mieloperoxidază) — H_2O_2 — halid. De asemenea, Sbarra (1972) susţine existenţa sistemului antimicrobian puternic ce se realizează printr-o reacţie peroxidazică dependentă de cloruri (ionul Cl^-) sau de ioduri (I^-). Sistemul implică decarboxilarea şi dezaminarea aminoacizilor bacterieni, cu formare de cloramine instabile, NH_3, CO_2, ioni halogeni şi aldehida corespunzătoare aminoacidului de la care a pornit reacţia (aldehida formică, dacă aminoacidul în cauză este glicocolul). Ansamblul reacţiilor este redat în fig. XIV.17.

Deoarece vacuola fagocitară (fagosomul) nu poate fi eliminată din celulă (granulocit sau macrofag), conţinutul său este revărsat în celulă distrugînd-o. Din acest motiv fagosomul este denumit „sac de sinucidere". Referitor la ierarhizarea fenomenelor biochimice implicate în bactericidie, există în prezent două ipoteze şi anume:

— *producerea* accelerată de H_2O_2, ce ar avea drept consecinţă directă stimularea şuntului pentozic;

— *stimularea* activităţii NADPH-oxidazei, flavinenzimă ce catalizează reducerea directă a oxigenului la H_2O_2 prin NADPH.

Declanşarea procesului de stimulare a şuntului pentozic s-ar face conform ipotezelor formulate de Graham şi colab. (1967), Rossi şi colab. (1971), prin schimbările biochimice ce se petrec la suprafaţa celulei fagocitante, intervenind în reglarea activităţii NADPH-oxidazei. Modificările metabolice intracelulare sînt mediate prin alterarea interacţiei lipide-proteine din membrana celulară.

3.2.1.4. *Patologia înnăscută a leucocitului*. Se cunosc două afecţiuni importante.

a) *Granulomatoza cronică letală* a copilului, cu transmisie recesivă legată de sex. A fost descrisă în 1957 de Good şi colab. În 1967 Holmes şi colab., Baehner

și Nathan au publicat datele esențiale asupra capacității metabolice deficitare a granulocitului în cursul fagocitozei, mai ales în etapa bactericidiei, anomalia fiind legată de producerea de H_2O_2. S-a observat că deși granuloci-

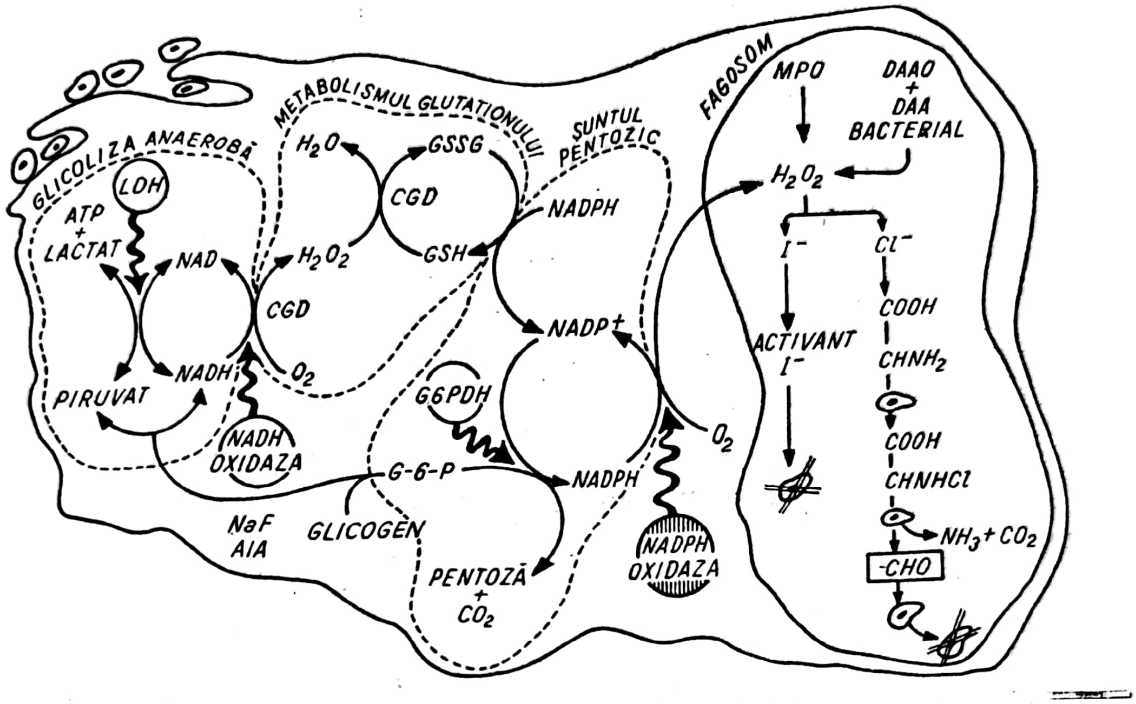


Fig. XIV.17. **Mecanism biochimic al bactericidiei** (după Sbarra, adaptare).

tele înglobează microorganismele și glicoliza anaerobă se intensifică, consumul de oxigen și producerea de H_2O_2 lipsesc iar bactericidia nu are loc. Deficitul enzimatic pare localizat principal la nivelul NADPH-oxidazei. Se cunosc variante cu localizarea viciului metabolic la nivelul MPO sau al glutation-reductazei (fig. XIV.18).

Tabloul clinic este dominat de infecții și supurații multiple. Deficitul dobîndit poate să apară după splenectomie precum și în unele limfopatii maligne. Examenele morfologice pun în evidență leziuni de tip granulomatos.

b. *Deficiența de Tufstin* determină sindromul familial al deficienței de fagocitoză, cu infecții prelungite și repetate. Lipsește tetrapeptidul stimulant al fagocitozei (thr-lis-pro-arginină) denumit tufstin.

Anomalii secundare, dobîndite, ale fagocitozei se pot petrece în leucemii acute, limfoame maligne, diabet zaharat, artrită reumatoidă etc.

Testarea funcțională a granulocitului se face în prezent cu ajutorul sărurilor de tetrazoliu — în special, prin testul cu Nitro — BT (Baehner L. R., Nathan D. G.) pentru investigarea funcției capitale a acesteia, fagocitoza și bactericidia. Tehnica se bazează pe reducerea NBT — cu formare de granulații de formazan violet purpur — ce reprezintă forma redusă a sării de tetrazoliu. Compusul de tetrazoliu funcționează ca acceptor al electronilor pe care NADPH-oxidaza și în mai mică măsură NADH-oxidaza i-au preluat de la NADPH și NADH, oxidînd aceste coenzime în formele NADP și NAD. Principiul testului este redat în fig. XIV.19. Testul este negativ în cazul de granulocitoză cronică la copiii de sex masculin și slab la cei de sex feminin.

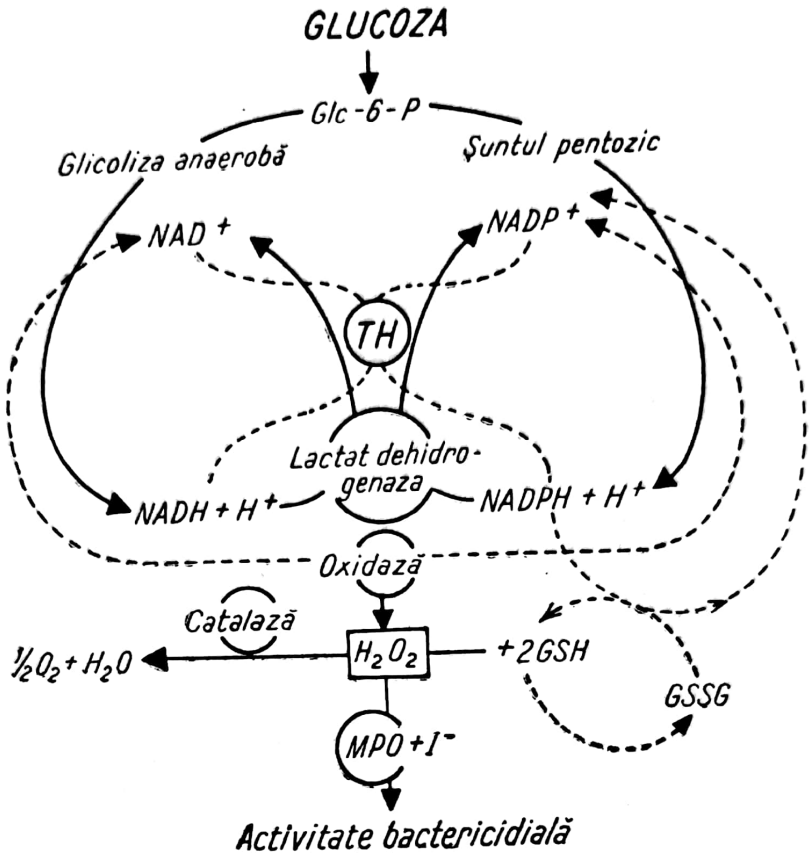


Fig. XIV.18. Deficitul metabolic în granulomatoza cronică letală a copilului.

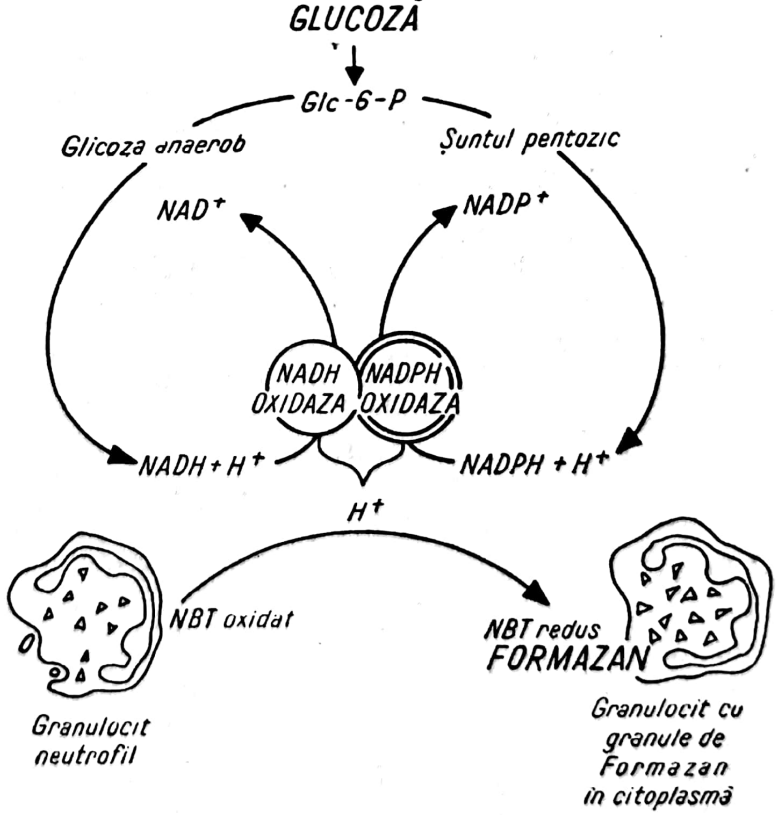


Fig. XIV.19. Principiul chimic al testului Nitro BT. (Baehner și Nathan).

Scanned with OKEN Scanner

O altă deficienţă enzimatică, pusă în evidenţă prin procesele mieloleucozice cronice, este absenţa fosfatazei alcaline, corelată cu prezenţa cromozomului Filadelfia-21.

3.2.1.5. *Eozinofilele şi bazofilele.* a) Eozinofilul posedă capacitatea fagocitantă. Factorii chimicotaxici activi asupra eozinofilului sînt complexele antigen-anticorp, complementul —$C_{5, 6, 7}$, fibrina, serotonina, histamina — care îi reduc efectul inflamator şi enzimele proteolitice. În cursul reacţiilor anafilactice, eozinofilul suferă acţiunea chimicotaxică a IgG_1. Se pare că eozinofilul are un rol în limitarea leziunilor produse prin complexele imune (1973). Deşi participă la procesele de apărare şi fenomenele energetice ce se petrec în cursul fagocitozei şi formării fagosomului, nu se cunosc încă cu precizie datele în această privinţă. b) *Bazofilul.* Acesta participă la fagocitoză într-o măsură mult mai redusă. Prin degranularea granulocitului respectiv se liberează histamină, serotonină şi heparină, factori de clarificare ai plasmei în cursul hiperlipemiei post-prandiale ce acţionează asupra trigliceridelor. Prin liberarea heparinei (agent antitrombinic), bazofilul este corelat şi cu hemostaza. Prin liberarea de histamină şi serotonină, bazofilul intervine în inflamaţii, substanţele respective liberate avînd o acţiune asupra vaselor.

3.2.2. MONOCITUL

Acesta se formează în măduva osoasă. El se diferenţiază în macrofag, schimbîndu-şi metabolismul odată cu morfologia, în funcţie de ţesutul în care s-a produs fenomenul. Macrofagele alveolare (pulmonare) au profil energetic oxidativ, respirator, iar altele sînt dependente de procesele glicolitice anaerobe. În granulaţiile lor conţin hidrolaze lisosomale şi peroxidaze care dispar prin diferenţierea în macrofag. Macrofagele tisulare se refac principal pe seama monocitelor din circulaţie, cu excepţia celulelor Kupffer ce se pot duplica „in situ".

3.3. TROMBOCITELE (INIŢIAL DENUMITE GLOBULINE)

Trombocitele sînt elemente figurate sanguine anucleate ce iau naştere în măduva osoasă din megacariocite. În microscopia optică trombocitul apare ca o frîntură de citoplasmă anucleată. Are o zonă centrală — *granulată* — şi o alta periferică, hialină, *hialomerul.* Sîngele periferic conţine 200 000 — 300 000/μl, producţia fiind în medie de 3 300 elemente pe minut. Au o viaţă medie de 9,5±0,6 zile, 2/3 dintre ele găsindu-se în sîngele circulant şi 1/3 fiind sechestrate în splină. Se produc din membranele reticulului endoplasmatic megacariocitar. În cursul genezei lor apar în megacariocit grupuri de 10—12 granulaţii azurofile, separate prin benzi fine de citoplasmă hialină. Membranele de demarcaţie se nasc din citoplasma megacariocitului, prin invaginaţia membranei plasmatice. Filamentele contractile de trombostenină — ce determină mişcările citoplasmatice în emiterea pseudopodelor — sînt produse în megacariocit, unde apar în număr mare în stadiul trombocitogen. Cînd mutaţia megacariocitului trombocitogen este completă, el emite prelungiri citoplasmatice în sinusoidele medulare unde se liberează trombocitele.

În pofida micimii lor — volum 5 μ, diametrul 2,5 μ — plachetele sanguine au o activitate metabolică înaltă ce constituie bazele moleculare ale importantelor funcţiuni pe care le îndeplinesc.

Scanned with OKEN Scanner

3.3.1. FUNCŢIILE TROMBOCITULUI

3.3.1.1. *Funcţia fundamentală* a trombocitului este participarea sa la hemostază, atît în faza celulară cît şi în cea plasmatică a coagulării. Acţiunea sa se desfăşoară în următorii patru timpi (sau etape):

— în timpul 1, parietal, ele exercită o acţiune vasculotonică, prin serotonina pe care o eliberează;

— în timpul 2, plachetar, realizează adezivitatea la sediul leziunii peretelui vascular şi agregarea cu formarea trombusului alb trombocitar, voluminos, permeabil şi fragil, care opreşte iniţial sîngerarea;

— în timpul 3, plasmatic, plachetele intervin în coagulare prin factorul 3 trombocitar de natură preponderent lichidă şi transportă factorii de coagulare în atmosfera periplachetară;

— în timpul 4, trombodinamic, prin contracţia trombosteninei se produce retracţia cheagului (în cursul căreia fibrina joacă probabil un rol pasiv).

În timp ce în primele etape procesul ar putea fi pasiv, celelalte etape finale sînt cauzate de aşa-numita „metamorfoză vîscoasă a cheagului". Acestui fenomen îi corespunde o evoluţie morfologică şi complexă a plachetelor, studiată în microscopia optică şi electronică. Se descriu, în mare, două stadii ale fenomenului: (a) aglutinarea prin fuziunea hialomerilor şi (b) contracţia aglutinatelor şi fuziunea granulomerilor.

3.3.1.2. *Funcţiile secundare ale trombocitelor* sînt reprezentate de: (a) implicaţiile pe care trombocitele le au în procesele imune; (b) fagocitoza complexelor imune şi a particulelor virale; (c) funcţia de protecţie a peretelui vascular, trombocitele fiind încorporate în stratul celular endotelial ce căptuşeşte vasele, infiltraţia avînd ca rezultat întărirea peretelui vascular.

3.3.2. BAZELE STRUCTURALE ALE FUNCŢIILOR TROMBOCITARE

Din studiile de microscopie electronică, completate cu investigaţii de citochimie şi citoenzimologie s-au obţinut unele date importante, deşi încă nu complete.

3.3.2.1. *Membrana trombocitară.* Plachetele posedă o membrană trilamelară, de natură lipoproteică bogată în receptori moleculari de suprafaţă. Ea conţine astfel multă glicoziltransferază — receptor pentru colagen, o proteină receptor pentru trombină şi alţi receptori pentru ADP şi amine biogene (serotonină, adrenalină).

Considerînd elementele structurale trombocitare dinspre membrană în afară, se notează încă trei straturi ce o înconjură şi se succedă într-o anumită ordine: (a) aşa numitul strat „pufos", alcătuit din glicoproteine şi mucopolizaharide, cu rol în fenomenul de adeziune; (b) aşa numita „atmosferă plasmatică", periplachetară, ce se suprapune într-o anumită măsură stratului precedent, cu rol în formarea fibrinei pe suprafaţa plachetară; (c) un sistem de microtubuli denumit „citoskeleton" ce funcţionează ca aparat contractil intrinsec, conţinînd trombostenina. Dealtfel, microtubulii pot suferi transformarea reversibilă în microfibrile.

3.3.2.2. *Organite celulare.* Din punct de vedere infrastructural, în citoplasma plachetară se găsesc: mitocondriile cu echipamentul enzimatic corespunzător fosforilării oxidative, lisosomii cu hidrolaze acide şi anumite granule.

Scanned with OKEN Scanner

Dintre acestea menționăm: *granulele* ce conțin fosfolipide, enzime hidrolazice și fibrinogen; corpii denși cu serotonină, catecolamine, ADP și ATP, factorul 4-trombocitar. În citoplasmă se mai găsesc granule de glicogen, bacterii, virusuri și complexe imune.

3.3.3. BAZELE MOLECULARE ALE FUNCȚIILOR TROMBOCITARE

Proteine. O mare parte din constituenții plachetari sînt de natură proteică (52% din greutatea uscată) incluzînd proteina funcțională importantă — *trombostenina* — și un bogat echipament enzimatic. Trombostenina însăși — proteină contractilă asemănătoare actomiozinei din mușchii scheletici — are activitate enzimatică, ATP-azică, activată prin Ca^{++} și Mg^{++}. Ea reprezintă 15% din proteinele totale ale trombocitelor umane, adică 1—3% din greutatea plachetei proaspete.

Lipidele sînt reprezentate principal, prin fosfolipide. Factorul 3-trombocitar din membranele și granulele plachetare este o lipoproteină termostabilă. În membrana trombocitară se găsește o cantitate apreciabilă de acid N-acetilneuraminic, fosfatidiletanolamină, serină și două cefaline importante pentru hemostază.

Hidrații de carbon reprezintă 8% din greutatea trombocitului. Acesta posedă și antigene specifice (de natură glicoproteică) și de histocompatibilitate (HL—A).

Echipamentul enzimatic al trombocitului este complex și corespunzător exigențelor funcționale ale principalelor căi energetice. În citosol sînt prezente enzimele active în glicoliza anaerobă și șuntul pentozic (cap. IX). În mitocondrii, ca în toate celulele, sînt localizate enzimele ciclului Krebs și ale transportului de electroni fosforilant. Mitocondriile plachetare posedă ADN și ARN (stabil), fiind în măsură să sintetizeze mici cantități de proteine (de exemplu, factorul de stabilizare al fibrinei).

Rezerva de NAD-NADH este corelată cu activitatea intensă a căii glicolitice trombocitare și corespunde unei cantități apreciabile. *Sistemul adenilic* este bine reprezentat și funcțional indispensabil, cu puncte de intervenție bine precizate. Conținutul în ATP este de 150 de ori mai mare decît al eritrocitului. Acești compuși sînt necesari menținerii funcțiilor endergonice plachetare și utilizați pe măsura nevoilor. În agregarea plachetară ATP și AMP ar acționa ca inhibitori. De asemenea, funcțiile de captare și transport asigurate de plachete sînt dependente de ADP.

AMP condiționează răspunsul trombocitar la diferiți stimuli. După cum s-a arătat, funcția trombocitară fundamentală se desfășoară în etape ce cuprind: adeziune, agregare primară, reacții de eliberare a unor componente, agregare secundară, contracții. Stimulatori ai funcției trombocitare sînt toate substanțele ce induc agregarea și reacțiile de liberare. Se cunosc: inductori slabi, cu greutate moleculară mică ca ADP, adrenalina, noradrenalina, vasopresina, serotonina; inductori puternici enzimatici — enzime proteolitice ca trombina, tripsina, veninuri de șerpi, papaina; inductori puternici de natură diferită ca: material particulat (latex), colagen, acizi grași, endotoxine, complexe antigen-anticorp. Ca urmare a interacției între membrana trombocitară și inductori se liberează ionii de Ca^{++}, activatori ai sistemelor enzimatice, corelate cu executarea funcțiilor (ca de ex. contracția celulei). După interacția membrano-trombocitară-inductor forma plachetelor se schimbă, devenind sferică din discoidală, cu apariția unor prelungiri, iar suprafața devine adezivă.

Scanned with OKEN Scanner

3.3.4. ANALOGIA METABOLICĂ INTRE TROMBOCIT ŞI MUŞCHIUL SCHELETIC DE „SALT"

Se vorbeşte despre această analogie în special în urma lucrărilor şcolii de la Marburg. Din lucrările lui Bücher şi ale lui Gross, Delbruck şi Vogel reiese că plachetele corespund din punct de vedere energetic tipului de muşchi striat de „salt", studiat la Locusta migratoria. Acest muşchi funcţionează periodic, exploziv şi cu lungi intervale de repaus. Faţă de acesta, trombocitul se situează ca un caz limită. Muşchiul conţine puţine mitocondrii dar este bogat în enzime glicolitice anaerobe ca şi trombocitul. Conţinutul în glicogen al plachetelor este foarte ridicat: 28 ± 10 M/10^{11} trombocite, corespunzător raportului de concentraţie din muşchi. Trombostenina, proteina contractilă trombocitară cu proprietăţi ATP-azice, Mg^{++} — activată ar aparţine, după Bettex-Galland şi Lüscher care au preparat-o, grupului actomiozinic. Ea ar fi suportul retracţiei cheagului „in vitro". Spre deosebire de muşchiul scheletic, trombocitul, nu conţine creatinfosfat kinaza (CPK) dar are enzimele şuntului pentozic, absente în muşchi.

În biologia trombocitului există un singur moment în care el este angajat într-o mare cheltuială de energie: metamorfoza vîscoasă şi retracţia cheagului. Se sugerează că metamorfoza vîscoasă şi retracţia cheagului sînt fenomene combinate, două expresii diferite ale capacităţii retractile a plachetelor. Prima se referă la retracţia în absenţa fibrinei, cealaltă în prezenţa ei. Afirmaţia se sprijină pe trei feluri de argumente şi anume:

— paralelismul care există „in vitro" între diminuarea glicolizei anaerobe, produsă prin inhibitori specifici în anumite concentraţii, scăderea nivelului de ATP şi pierderea retractilităţii cheagului. Monoiodacetatul inhibitor al gliceraldehid-3-fosfat-dehidrogenazei şi NaF, inhibitor al glicolizei la nivelul enolazei, abolesc reacţia cheagului. Prin inhibiţia hexokinazei prin 3,5 dinitrobenzoilglucozamină se provoacă de asemenea inhibiţia retracţiei cheagului;

— capacitatea cheagului de a se retracta corespunde unei concentraţii critice de ATP; anume, 50% din valoarea normală. Diminuarea concentraţiei ATP precede retracţia cheagului. În trombocitul intact ATP este „protejat" de distrugerea sa prin ATP-ază. Contactul între ATP—ATP-ază s-ar produce numai în momentul metamorfozei vîscoase;

— *în trombastenii*, în care metamorfoza vîscoasă este tulburată şi cheagul neretractil, se semnalează scăderea intensităţii glicolizei şi a nivelului corespunzător de ATP.

Privind în linii mari ansamblul metabolic al trombocitelor, trebuie subliniat faptul că ele dispun de un sistem glicolitic foarte dezvoltat, susceptibil de a fi activat la începutul retracţiei. Puterea lor retractilă este în raport cu nivelul de concentraţie al ATP-ului, ce se consumă în cursul retracţiei cheagului.

3.3.5. PATOLOGIA BIOCHIMICĂ A TROMBOCITULUI

Dintre anomaliile enzimatice plachetare, o atenţie deosebită se acordă bolii lui Glanzmann, trombastenia hemoragică ereditară, ce pare să aibă transmisie recesivă, autosomală, cu atingerea ambelor sexe. Tabloul biologic

Scanned with OKEN Scanner

este caracterizat prin: (a) număr obişnuit de trombocite, dar anormale, rotunde, mici, întotdeauna izolate pe lamă, cu defecte de formare a pseudopodelor şi absenţa metamorfozei vîscoase; (b) coagulare normală, eliberarea factorului plachetar 3 nefiind modificată; (c) cheagul nu se retractă, trombocitele fiind incapabile de a suferi metamorfoza vîscoasă. Pe plan molecular, deficitul priveşte trei aspecte: metabolismul glucidic, ATP şi trombostenina. Într-o formă de trombastenie este pierdută activitatea a două enzime-cheie a glicolizei anaerobe; gliceraldehidfosfatdehidrogenaza (GAPDH) şi piruvatkinaza (PK), cu scăderea consecutivă a nivelului de ATP. O altă formă este cu nivel normal al celor două enzime glicolitice dar cu scădere de ATP. Se mai cunosc şi alte tulburări congenitale ca: cele de adeziune la colagen sau la alte structuri subendoteliale (Wilebrand), tulburări în liberarea de ADP (efect asemănător excesului terapeutic de aspirină), tulburare primară de agregare la ADP (trombastenie).

4. HEMOSTAZA ŞI FIBRINOLIZA

Un important capitol al biochimiei sîngelui îl constituie factorii şi mecanismele de reacţie care fundamentează, la nivelul molecular fenomenul complex denumit de autorii anglo-saxoni „hemostazia hemostazei", denumire (adoptată şi de hematologii români), iar de cei latini „echilibrul fluido-coagulant" sau funcţia de coagulabilitate. Hemostaza împreună cu fibrinoliza alcătuiesc un sistem de mecanisme antagoniste şi interdependente, din al căror echilibru funcţional rezultă atît păstrarea potenţialului hemostatic al sîngelui, cît şi fluiditatea acestuia. Deşi cele două procese alcătuiesc un tot funcţional interdependent, prezentarea analitică a fiecăruia în parte se impune ca o necesitate pentru înţelegerea mai bună a ansamblului. Atît coagularea, cît şi fibrinoliza sînt procese reglate enzimatic, a căror tulburare şi dezechilibru favorizează fie formarea de trombuşi (cheaguri) — prin activarea coagulării sau scăderea fibrinolizei — fie sîngerare prin scăderea coagulării şi creşterea fibrinolizei.

4.1. COAGULAREA

(FAZELE ŞI FACTORII PRINCIPALI AI COAGULĂRII)

În esenţă, fenomenul coagulării sîngelui constă în transformarea fibrinogenului în fibrină insolubilă. Particularităţile caracteristice procesului sînt:

— numărul mare de activatori şi inhibitori care intervin;

— existenţa, ca precursori, a majorităţii factorilor coagulării;

— preponderent, factorii coagulării sînt proteaze ce se produc prin proteoliză limitată, din formele lor inactive;

— transformarea factorilor coagulării din forme inactive în forme active se face prin autocataliză, determinată de propriile lor produse;

— unii dintre factori, ca de ex. Ca^{++}, au acţiune multiplă, intervenind aproape în toţi timpii coagulării;

— procesul complex se desfăşoară „în cascadă". Faza de latenţă este formată de o avalanşă de transformări accelerate ale factorilor coagulării, prin forme inactive şi forme active.

Scanned with OKEN Scanner

Fenomenul implică participarea unui număr de 13 factori cunoscuți la care se adaugă în prezent, factorul Willebrand (deci al 14-lea). Descoperirea fibrinei de către Malpighi, apoi a fibrinogenului (1859), a tromboplastinei — produsă din trombocite la contactul cu o suprafață străină — și cunoașterea acțiunii ionilor de Ca^{++}, au pus bazele teoriei clasice a coagulării, datorată lui Morawitz, exprimată în fig. XIV.20.

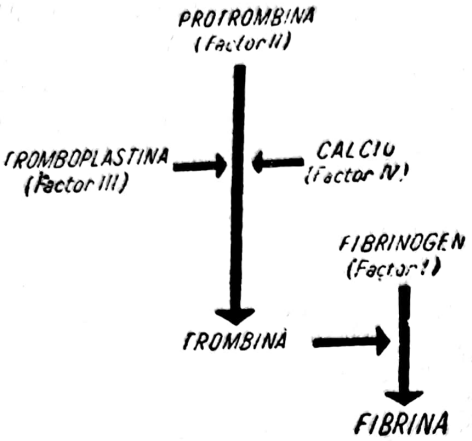


Fig. XIV.20. Schema coagulării sîngelui — Morawitz.

În desfășurarea procesului coagulării, se deosebesc faze distincte care, în ordinea desfășurării lor cronologice, se eșalonează în doi timpi și anume:

— *timpul parietal*, în cursul căruia se produce vasoconstricția capilarelor în țesutul lezat, controlată prin serotonină, catecolamine, elaborate de trombocite și peretele lezat. Fibrele de colagen ale vasului lezat atrag trombocitele prin acțiuni electrostatice, datorate grupărilor hidrocarbonate legate de resturile hidroxilizinei pe care le conține. Pe primul strat plachetar fixat astfel se așază mai departe alte trombocite cu producerea unui agregat pentru a cărui formare este necesar ATP. După agregarea lor, trombocitele suferă așa numita metamorfoză vîscoasă, fenomen de liză cu formarea unei mase vîscoase. În cursul acestei transformări se pun în libertate o serie de factori proprii trombocitari, catalizatori indispensabili ai coagulării, mai ales factorul 3 tromboplastic, factorul protidic F_2 precum și compuși activi ca: serotonina, accelerina, antifibrinolizina;

— *timpul plasmatic*, faza adevărată a coagulării, care conduce la formarea cheagului rezistent, în care sînt implicate mecanisme chimice în acțiune: căile *extrinsecă* și *intrinsecă* ce vor fi prezentate mai departe, în amănunt. Procesul se desfășoară în patru etape succesive: producerea protrombinazei, generarea trombinei, transformarea fibrinogenului în fibrină cu stabilizarea acestuia, sinereza și retracția cheagului. Fibrinoliza este ultimul timp al procesului care se realizează în homeostazia hemostazei.*

Principalii factori ai coagulării sînt redați, cu caracteristicile lor în tabelul XIV.1.

Factorul I sau *fibrinogenul* este o proteină cu formă moleculară alungită, cu raport axial 20 : 1, una din cele mai puțin solubile din sistemul proteic sanguin. Are mobilitate electroforetică β-γ; este conținut în fracțiunea I a lui Cohn, obținută la o concentrație de 8% etanol, pH 2,7 la temperatură 0°. Este o glicoproteină cu greutate moleculară 330 000—340 000 daltoni, avînd coeficient de sedimentare 7,60 și punct izoelectric 5,3. Numai 40% din moleculă are structura helicoidală. Fibrinogenul este alcătuit din 6 lanțuri peptidice, grupate cîte două. Perechile diferă una de cealaltă prin aminoacidul N-terminal și anume: o pereche are tirozina ca grupare terminală, a doua are acidul piroglutamic, iar a treia alanina. Componentele glucidice sînt în

* Nomenclatura adoptată pentru diferiții factori ai coagulării nu este unită. Atît diversitatea denumirilor cît și păstrarea acelora care reprezintă numele patronomic al bolnavilor, creează un oarecare grad de confuzie și face dificilă descrierea fenomenului (C. Poppa).

următoarele proporţii: hexoze (D-galactoză şi D-manoză) 1,6—3,2%, aminozaharuri 0,56—1% şi acid sialic 0,5—0,8%. Unirea lanţurilor glucidice cu cele peptidice se face printr-o legătură glicozil-aminil-arginină (aspartat-N-

Tabelul XIV.1

Factorii coagulării

Factor	Denumire	T/2	Biosinteza cu participarea vitaminei K	Coagulopatie congenitală
I	fibrinogen	cca 5 zile	—	afibrinogenemie, hipofibrinogenemie, disfibrinogenemie
II	protrombină	2—3 zile	+	hipoprotrombinemie
III	tromboplastina tisulară			
IV	calciu	—	—	—
V	accelerina (globulina accelerătoare, factor labil)		—	parahemofilie OWREN (hipoaccelerinemie)
VI	anulat	—	—	—
VII	proconvertina, factor stabil	5 ore	+	hipoproconvertinemie
VIII	factor A antihemofilic	20 ore	—	hemofilia A
IX	factorul B antihemofilic, factor Christmas	20 ore	+	hemofilia B, lipsă factor Stuart-Prower
X	factor Stuart-Prower	2 zile	+	
XI	antecedentul plastinei plasmatice (PTA)	2 zile	—	lipsă PTA (sindrom ROSENTHAL)
XII	factor Hageman	2 zile	—	lipsă factor Hageman
XIII	factor stabilizator fibrină (FSF) Laki-Lordand	5 zile	—	lipsă FSF

acetil-glucozaminil-arginină, ca în orozomucoid şi γ-globuline). Este de subliniat faptul că oxidarea glucidelor din fibrinogen îl face inapt pentru fenomenul coagulării.

Transformarea fibrinogenului în fibrină se poate realiza atît artificial, cît şi fiziologic. În primul caz se poate obţine prin factori chimici — ninhidrină, aloxan, cloramină T — şi prin factori biologici — enzime proteolitice, coagulaza din veninul de şarpe crotal, stafilocoagulaza.

Fiziologic, transformarea fibrinogenului în fibrină se petrece în 2—3 secunde sub acţiunea trombinei. Datele de microscopie electronică arată structura fină a fibrinei, ce se prezintă sub forma de fibrile striate transversal, cu o periodicitate medie de 230 Å.

Cinetica reacţiei enzimatice catalizată de trombină este reglată prin relaţia Quik: timpul de coagulare $T = \frac{K}{C}$ în care C este concentraţia trombinei iar K o constantă dependentă de forţa ionică a mediului, de pH şi de efectori. Trombina acţionează ca o protează de tipul tripsinei. Transformarea fibrinogenului în fibrină este un fenomen de proteoliză limitată, în cursul căruia se produc două lanţuri polipeptidice diferite: fibrinopeptidele A şi B (fig. XIV.21), conform reacţiei:

$$\text{fibrinogen} \xrightarrow{\text{trombina}} \text{fibrină} + \text{fibrinopeptidele A şi B}$$

În fiecare pereche de lanţuri peptidice trombina desface fragmente a căror greutate moleculară reprezintă în total circa 2% din aceea a fibrino-

Scanned with OKEN Scanner

genului. Fibrina umană conţine ca grupări N-terminale, tirozina şi glicocolul. Proteoliza limitată, catalizată de trombină, secţionează patru din cele şase lanţuri. Trombina hidrolizează legăturile arginină-glicocol iar lanţurile tirozin-terminale nu sînt antrenate în fenomenul de conversiune a fibrinogenului în fibrină.

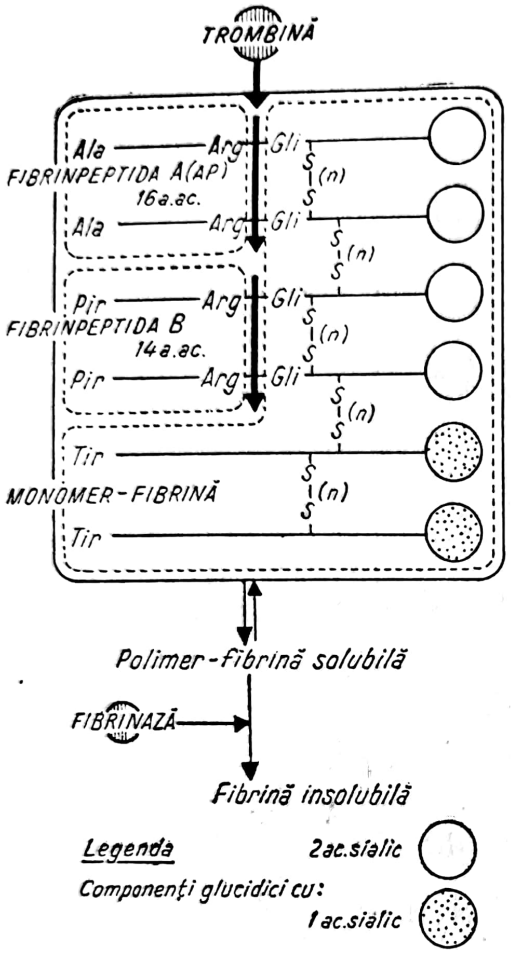


Fig. XIV.21. Transformarea fibrinogenului în fibrină: producerea fibrinopeptidelor A şi B. Structura fibrinopeptidelor după Blömback.

Structura fibrinopeptidelor umane a fost determinată în întregime (Blömback şi col., Edman şi col.). În toate lanţurile fibrinopeptidice arginina ocupă capătul N-terminal. În peptidul A se disting lanţurile A şi AP, care au fiecare 16 resturi de aminoacizi. Diferenţa între cele două lanţuri constă în prezenţa unui rest fosfat-serină în poziţia 3 a catenei peptidice AP. Peptidul A posedă o secvenţă aminoacidă Asp-Ser-Glu- analoagă centrului activ al mai multor proteaze, denumite din acest motiv „serin enzime". Peptidul B, care conţine 14 aminoacizi (greutate moleculară 1 553 daltoni) are în capătul terminal acidul piroglutamic. Datorită înlănţuirii -Phe-Phe-, el este puţin solubil în apă. Structura fibrinopeptidelor este variabilă cu specia. Prin desprinderea fibrinopeptidelor se formează monomerul de fibrină. Odată cu fibrinopeptidele se pierde un număr mare de sarcini negative, condiţie ce favorizează asocierea monomerilor sub forma de polimeri intermediari în care legăturile sînt de tip necovalent, realizate prin interreacţii hidrofobe şi punţi de H. Polimerul reprezintă fibrina solubilă care din punct de vedere mecanic este instabilă. Polimerizarea monomerilor de fibrină se face pe două direcţii: longitudinală cu formarea fibrilelor sau fibrelor primare de fibrină şi transversală, cu producerea fibrelor secundare de fibrină, datorită punţilor de H ce se stabilesc între tirozina şi histidina din două fibre primare. Această polimerizare în dublă direcţie are ca efect o gelificare, cu trecerea monomerilor de fibrină din starea de sol, în cea de gel. Fibrinaza sau factorul Lacki-Lorand de stabilizare a fibrinei, activat prin trombină, intervine pentru formarea fibrinei insolubile care conferă cheagului rigiditate. Efectul se datoreşte faptului că se stabilesc legături covalente, peptidice, între grupările α-amino din resturile de lizină şi grupările carboxil din resturile de glutamină. Se pare că fibrinaza intervine şi la nivelul resturilor de acid sialic. Prin retracţie, cheagul liberează serul care are în minus faţă de plasmă fibrinogenul. Toţi ceilalţi factori ai coagulării, cu excepţia tromboplastinei tisulare sînt glicoproteine ca şi fibrinogenul (concentraţie plasmatică: 200 – 400 mg %).

Factorul II sau *protrombina* este o proendopeptidază, precursor al trombinei de natură glicoproteică, cu mobilitate α_2-globulinică. Greutatea sa moleculară este de 63 000 daltoni, avînd un punct izoelectric de 5. Este caracterizată printr-un conţinut ridicat de acizi glutamic şi aspartic, arginină, lizină şi triptofan. Conţine 4,6% hexoze, 2,3% hexozamine, 4,2% acid sialic, 0,09% fucoză. Este sintetizată în ficat în prezenţa vitaminei K şi atinge în plasmă concentraţia de 80 mg%. Este absorbită pe sulfat de Ba şi fosfat tricalcic. Antivitaminele K coboară nivelul protrombinei ca şi al tuturor factorilor absorbabili pe sulfat de Ba (proconvertina, factorul Stuart, antihemofilic B).

Factorul III sau *tromboplastina tisulară*, sinonim cu trombokinaza sau tromboplastina extrinsecă. Această substanţă catalizează transformarea protrombinei în trombină şi este de natură lipoproteică. Activitatea sa este legată de microsomi.

Factorul IV este reprezentat de ionii Ca^{++} ce acţionează în diferite etape ale coagulării, catalizează mai multe trepte ale formării trombinei.

Factorul V, *proaccelerina* sinonim cu accelerina, trombokinaza sau tromboplastina intrinsecă este un factor labil, o globulină cu mobilitate electroforetică $\alpha_2-\beta$, greutate moleculară 290 000 şi punct izoelectric 8,68. Proaccelerina este trecută în forma sa activată prin factorul STUART activat (factor X). Proaccelerina activată este sinonimă cu principiul de convertire al protrombinei, PCT (Prothrombin converting Principle). Transformarea se face numai în prezenţa ionilor de Ca^{++} . Se realizează fie printr-un mecanism de activare rapidă (20—30 sec.), avînd ca punct de plecare tromboplastina tisulară liberată prin leziunea vasculară, fie printr-un mecanism mai lent care implică un număr mai mare de factori participanţi (durează cîteva minute).

Factorul VI a fost anulat.

Factorul VII sau *proconvertina*, factor stabil sinonim cu cotromboplastina sau autoprotrombina I. Este o globulină cu mobilitate electroforetică $\alpha-\beta$ cu greutate moleculară 15 000—25 000, în sîngele normal avînd concentraţia 10—15 mg/l. Este sintetizată în ficat cu participarea vitaminei K şi localizată în fracţiunea I a lui Cohn.

Factorul VIII. Globulina antihemofilică A (AHG) sinonim cofactorul plachetar I, tromboplastinogen A (F.A.H., factor A antitrombinic, antihemofilic) este o α_2-globulină, cu greutate moleculară 190 000 daltoni, coeficient de sedimentare 6,5, punct izoelectric 6,4. În plasma umană are concentraţia de 0,05 mg/ml=1 uI/ml.

Factorul IX sau F.A.H.B., sinonim cu factorul antihemofilic B, factorul Christmas, cofactor plachetar II, autoprotrombina II, tromboplastina B este o $\alpha_1-\alpha_2$ globulină după unii autori, iar după alţii are mobilitate electroforetică β, cu greutate moleculară 50 000—110 000 daltoni, coeficient de sedimentare 4,33. Concentraţia sa este de 1 uI/ml plasmă sau ser. Este sintetizat în ficat cu participarea vitaminei K. Este activat în prezenţa ionilor de Ca^{++}, heparina suprimînd acest efect.

Factorul X, *Stuart-Prower* sau *autoprotrombina III*, este o α_1-globulină cu greutate moleculară 85 000—87 000 daltoni, coeficient de sedimentare 4,23 pH izoelectric 4,75. Este sintetizat în ficat în prezenţa vitaminei K. Poate fi activat prin enzime proteolitice — tripsină, papaină — sau prin citrat de sodiu 25%. În cursul activării se produc schimbări la nivelul grupă-

Scanned with OKEN Scanner

rilor N-terminal din lanţul peptidic respectiv. Factorul Stuart activat este sinonim cu antiprotrombina C a lui Seegers. Este o glicoproteină cu 7% glucide şi greutate moleculară 24 000 daltoni. Are activitate esterazică şi poate fi inhibat prin inhibitorul tripsinei din boabele de soia.

Factorul XI sau Rosenthal sau PTA este o β-globulină cu activitate esterazică. Hidrolizează esterul metilic al tosil-argininei sau TAME (tosil-arginină-metil-ester).

Factorul XII sau *factorul Hageman*, factor de contact sau factor de suprafaţă (surface factor) este o α_2-globulină cu greutate moleculară 82 000 daltoni, coeficient de sedimentare 7,68 şi pH izoelectric 7,08. În plasmă are concentraţia de 0,01 mg/ml. Este instabil, activat prin contactul cu sticla sau prin acidul elagic, derivat din acidul galic.

Factorul XIII, fibrinaza sau FSF (factor de stabilizare a fibrinei), sinonim cu factorul Laki-Lorand. Este o transglutaminază plasmatică. Are o mobilitate electroforetică α_2 cu greutate moleculară de 170 000 şi se asociază cu gamaglobulină cu greutate moleculară 350 000.

Factorul XIV cunoscut mai ales prin funcţia nu şi prin natura sa, este socotit factor de antisîngerare sau anti-Wilebrand sau factorul Nilsson. În ansamblu factorii coagulării rămîn totuşi 13 deoarece al şaselea s-a arătat deja că a fost anulat, aşa încît factorul XIV este de fapt al XIII-lea. Pe lîngă aceşti factori ai coagulării plasmatice sau tisulari, desemnaţi prin cifre romane, se cunosc încă nouă factori plachetari, desemnaţi prin cifre arabe. Şi într-un caz şi în celălalt numerotarea lor nu indică ordinea în care ei intră în procesul de coagulare, ci numai ordinea cronologică a descoperirii lor. Cei nouă factori plachetari consideraţi astăzi sînt: F_p1, care ia parte la conversiunea protrombinei în trombină; F_p2 care este implicat în transformarea fibrinogenului în fibrină; F_p3 (PTF) este un fosfolipid plachetar implicat în formarea protrombinazei; F_p4 — sau antiheparina; F_p5 sau serotonina; F_p6 — sau fibrinogenul plachetar; F_p7 — sau trombostenina; F_p8 sau antifibrinolizina plachetară; F_p9 — sau factorul stabilizant al fibrinei.

Mecanismul coagulării. Acesta se desfăşoară pe două căi ce se deosebesc după originea tisulară sau sanguină a factorului de declanşare a procesului „în cascadă". *Calea extrinsecă*, scurtă, cu durată de ordinul secundelor, reactualizează de fapt schema lui Morawitz. Factorul de declanşare îl constituie sucul celular liberat din celulele ţesutului lezat. Are două etape importante: generarea protrombinazei şi producerea trombinei. În acest mecanism intervin: ionii de Ca^{++}, factorul III — tromboplastina tisulară sau trombokinaza, proconvertina (factorul VII) care nu intervine decît pe această cale extrinsecă. Trombina acţionează asupra fibrinogenului transformîndu-l în fibrină. Fibrina formată în această fază este foarte fragilă.

Calea intrinsecă. Pe această cale — mai lentă — a cărei durată este de ordinul minutelor, intervin opt factori. Calea intrinsecă se desfăşoară în patru etape eşalonate astfel: (a) generarea protrombinazei; (b) producerea trombinei; (c) transformarea fibrinogenului în fibrină, cu stabilizarea acestuia; (d) sinereza şi retracţia cheagului. În calea intrinsecă sînt implicaţi numai factorii sanguini. Procesul este declanşat prin activarea factorului XII, ca urmare a fenomenului de suprafaţă, de hemosorbţie, pe care-l suferă acest factor de contact la nivelul leziunii vasculare; „in vivo", iar „in vitro" prin contactul cu orice suprafaţă de sticlă sau metal. Au loc interacţii electrostatice, deplasări de electroni între suprafaţa de contact şi factorul în cauză.

Scanned with OKEN Scanner

Se declanşează o avalanşă de activări în trepte, redate în fig. XIV.22. Urmează apoi clivarea fibrinogenului cu producerea polimerului de fibrină, instabilă, trecut în formă stabilă prin acţiunea factorului XIII. Cheagul

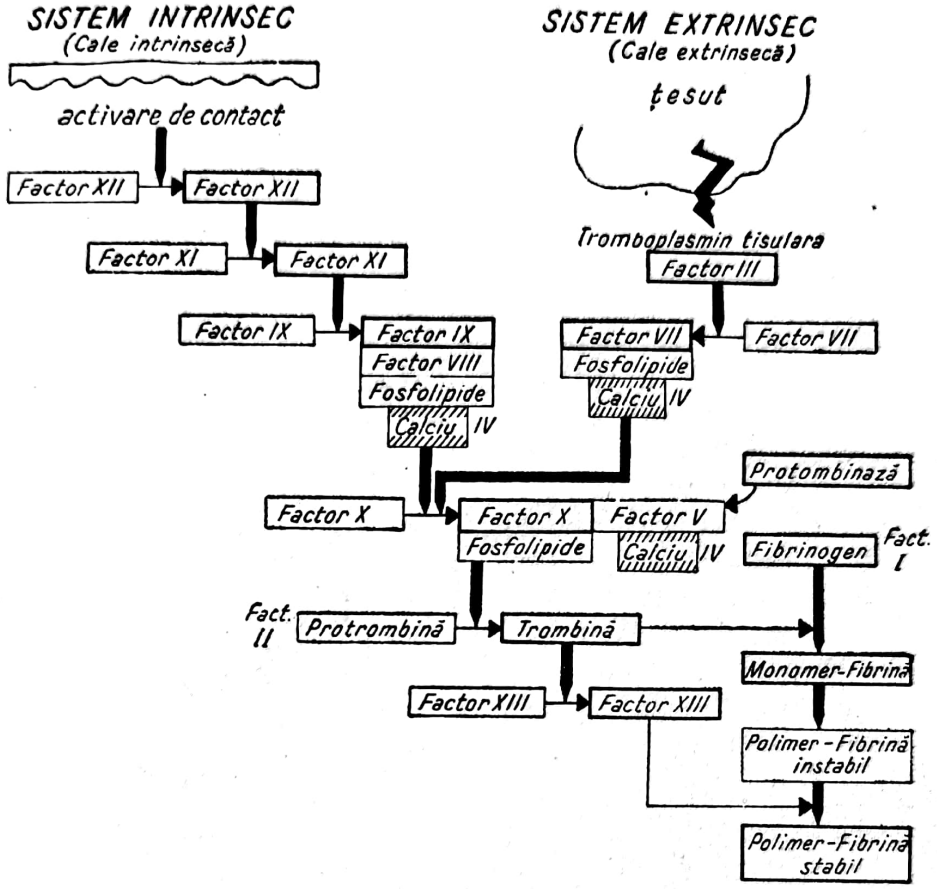


Fig. XIV.22. Schema coagulării:
a) cale intrinsecă; b) cale extrinsecă.

format din fibrină nestabilizată este solubil în soluţii de uree 5 M, ce determină ruptura punţilor de hidrogen. Factorul XIII stabilizează fibrina, făcînd-o insolubilă prin constituirea unei punţi disulfurice între glicina terminală a unui monomer şi gruparea NH_2 de pe monomerul vecin. Urmează apoi sinereza cheagului prin expulzarea apei din ochiurile gelului, cu micşorarea spaţiului dintre fibrile. Retracţia cheagului se produce numai în prezenţa trombocitelor, funcţional normale, ce acţionează prin trombostenina contractilă (F_1 plachetar). În punctele nodale ale reţelei de fibrină plachetele funcţionează ca centrii mecanici şi energetici ai retracţiei cheagului. Ele se lipesc de filamentele de fibrină şi prin descompunerea moleculelor macroergice ATP asigură contracţia trombosteninei care antrenează micşorarea în sens longitudinal a fibrelor de fibrină, ce sînt aduse pasiv la acest rezultat.

4.1.1. INHIBITORI AI COAGULĂRII

Sîngele conţine şi factori inhibitori ai coagulării care reduc viteza acestui proces. Din grupul antitrombinelor fac parte fibrina însăşi, antitrombina I, heparina sau antitrombina II şi antitrombinele III, V, VII, insuficient studiate. Anticoagulantele cu aplicare terapeutică mai folosite sînt heparina

Scanned with OKEN Scanner

și antagoniștii vitaminei K. Heparina este un mucopolizaharid ce conține glucozamină, acid glucuronic și o cantitate apreciabilă de funcții ester sulfurice. Heparina inhibă direct atît activitatea factorului X cît și acțiunea enzimatică a trombinei deja formate. Acțiunea sa depinde de gradul de sulfatare: un mg corespunde la circa 100—300 u.i. și poate inhiba coagularea la 100—130 ml sînge. Heparina are și efect lipolitic prin lipoproteinlipaza pe care o conține. Este distrusă în ficat, prin heparinaze.

Antagoniștii vitaminei K sînt derivați din 4-hidroxi-cumarină și inden-1, 3-dionă, ce acționează indirect și competitiv cu vitamina K, în biosinteza factorilor V, VII, IX și din ficat.

4.2. FIBRINOLIZA

Este ultima fază a hemostazei, ce are ca efect eliminarea fragmentelor de cheag și a depozitelor de fibrină. Se realizează prin mecanism enzimatic fiind catalizată de plasmină sau fibrinolizină. Aceasta scindează fibrina în fragmente polipeptidice mici, solubile ce nu mai pot forma rețele coerente. *Plasminogenul* poate fi activat în sistem intra- și extravascular. Activatorii se găsesc în sînge și în toate fluidele biologice ale organismului (fig. XIV.23). Produsele secundare ale fibrinolizei inhibă formarea trombinei și polimerizarea monomerilor de fibrină. Plasminogenul poate fi activat sau inhibat.

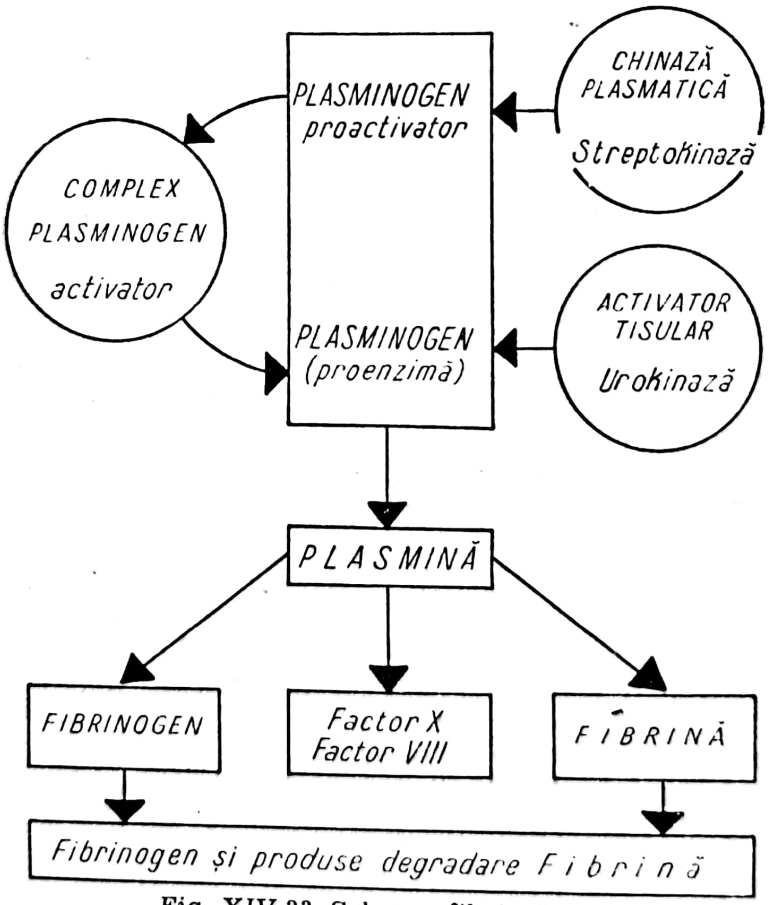


Fig. XIV.23. Schema fibrinolizei.

Streptokinaza, proteină streptococică neenzimatică, formează cu plasminogenul un complex, prin interacții hidrofobe, care transformă moleculele de fibrinogen în plasmină. În urină se găsește urokinaza, activator al plasmino-

genului ce provine din sînge şi ţesuturi. Ca inhibitori ai procesului pot fi menţionate proteinele cu o activitate antiplasminică, ca α_2-macroglobulina, α_1-antitripsina şi antitrombina III. Fibrinoliza patologic crescută se întîlneşte în leucoze, după intervenţii chirurgicale pe organe bogate în activatori ai fibrinolizei (uter, prostată, plămîn). Poate fi inhibată prin antifibrinolitice ca acidul ε-aminocaproic, acid p-aminometilbenzoic sau trasilol.

Patologia biochimică a coagulării. Această patologie poate privi fiecare din fazele procesului, producîndu-se vazopatii, trombocitopatii şi coagulopatii. Coagulopatiile mai cunoscute, sînt redate în esenţă în tabel XIV.1. Investigaţiile de laborator în patologia hemostazei se adresează tuturor timpilor prezentaţi. Fiind de strictă specialitate, în acest capitol se menţionează numai dozarea fibrinogenului care se realizează în laborator prin trei variante principale importante: colorimetrie pe baza reacţiei cu reactivul Folin-Ciocîlteu, prin reacţia biuretului şi gravimetric.

5. PROTEINELE PLASMATICE

Proteinele plasmatice sînt un amestec heterogen de aproape 100 componente cu proprietăţi fizico-chimice şi funcţii diferite. Unele dintre ele sînt holoproteine, iar altele complexe proteice cu glucidele — glicoproteine, cca 80% dintre proteinele plasmatice, cu lipidele — lipoproteine, cu metalele — metal proteine. Greutăţile moleculare ale acestora pot varia între 60 000 şi 1 300 000. Într-un volum total de sînge de 5 l, cu un hematocrit de 40%, cei trei litri de plasmă conţin 180—240 g proteine, corespunzînd la 6—8 g proteine la 100 ml plasmă. Serul diferă de plasmă prin lipsa fibrinogenului, care este reţinut în cheag. Proteinele plasmatice se află în schimb metabolic continuu cu proteinele tisulare, faptul fiind dovedit prin metode radioizotopice. Proteinele plasmatice sînt prezente în spaţiul extravascular într-o concentraţie de 1 g/100 ml, fiind în echilibru dinamic cu cele intravasculare. În spaţiul extracelular se găsesc în total 400 g proteine. Sînt sintetizate preponderent în ficat şi în ţesutul SRH (limfocite, plasmocite). Informaţia genetică pentru biosinteza lor este ca de altfel pentru toate proteinele, conţinută în ADN-ul din nucleul celulelor formatoare, ce codifică fiecare aminoacid prin tripletul corespunzător lui. Cu cele patru baze pirimidinice şi purinice (adenină, guanină, timină, citozină) se formează 4^3 adică 64 de tripleţi diferiţi. Procesul de sinteză se desfăşoară în modul arătat la sinteza proteinelor — capitolul VI.

5.1. FUNCŢIILE PROTEINELOR PLASMATICE

Importantele funcţii pe care proteinele plasmatice le au de îndeplinit, sînt următoarele:

— menţin volumul normal şi presiunea coloid osmotică a sîngelui, precum şi schimburile dintre capilare şi ţesuturi. Albuminele sînt preponderent răspunzătoare de această funcţie;

— transportă hormoni, metale, lipide, vitamine, pigmenţi coloranţi, medicamente, dispunînd de o suprafaţă totală de circa 700 000 m^2;

— participă la procesele de apărare specifică şi nespecifică a organismului prin: imunoglobuline, sistemul complement, properdină, lizozim, transferină,

Scanned with OKEN Scanner

precum şi la fenomenele de coagulare şi fibrinoliză prin factorii prezentaţi mai înainte;

— participă la menţinerea echilibrului acido-bazic al sîngelui, ca sistem tampon, datorită caracterului lor amfoter;

— influenţează vîscozitatea şi microcirculaţia, contribuind la realizarea unui mediu protector pentru eritrocite şi favorizîndu-le mobilitatea;

— reprezintă o rezervă proteică importantă în situaţiile în care aportul proteic scade.

Aceste funcţii sînt dezvoltate odată cu prezentarea fiecărei fracţiuni în parte sau încadrate în ansamblul fenomenelor sau sistemelor la care participă (echilibrul acido-bazic, biochimia răspunsului imun, homeostazia coagulării).

5.2. METODE DE DOZARE, SEPARARE ŞI CARACTERIZARE ALE PROTEINELOR PLASMATICE

Aceste metode sînt, în principiu, metodele care se pot aplica dozării proteinelor, în general. Ele se bazează pe proprietăţile fizico-chimice caracteristice acestui grup de substanţe: solubilitate, masă moleculară, polaritate electrică, reactivitate chimică.

5.2.1. METODE DE DOZARE

5.2.1.1. *Metodele fotocolorimetrice* sînt cele mai răspîndite. Dintre ele, curent se aplică două şi anume cea bazată pe reacţia biuretului (Weichselbaum, Gornall) şi reacţia Lowry.

Reacţia biuretului se bazează pe formarea complexului colorat în violet purpur, pe care legăturile peptidice îl formează cu reactivul alcalin cuprotartric (reactivul biuretului). Reacţia Lowry foloseşte în completare faţă de reacţia biuretului, reactivul fenolic, Folin-Ciocîltău. Metoda se bazează pe reducerea reactivului fosfo-molbdo-tungstic de către tirozina şi triptofanul din constituţia proteinei respective. Metoda Lowry se aplică cu succes în medii hipoproteice.

5.2.1.2. *Metodele bazate pe absorbţie în UV*, între 210—280 nm. La 280 nm absorbţia este datorată, în special, tirozinei şi triptofanului din proteine. La 210 nm absorbţia este direct proporţională cu concentraţia lanţurilor peptidice. Aceste metode sînt recomandabile pentru măsurători continue, cerute în aplicarea procedeelor cromatografice de separare (pe coloane cu schimbători de ioni).

5.2.1.3. *Metodele imunochimice* (Mancini, Carbonara, Heremans) sînt bazate pe imunodifuzie radială cu anticorpul specific inclus în geloză. Aprecierea cantitativă a proteinei precipitată în disc prin anticorpul său specific se face prin măsurarea diametrului discului de precipitare, cu exprimarea în miligrame la % sau în u.i. de proteine.

Valorile normale ale proteinemiei la adulţi sînt cuprinse între 6,7—8,7 g în 100 ml plasmă. La nou-născuţi: 5,0—6,5 g/100 ml plasmă.

5.2.1.4. *Metodele bazate pe alte proprietăţi fizice:*

— *metodele refractometrice* au la bază relaţia dintre indicele de refracţie a serului şi concentraţia proteinelor plasmatice. Valorile normale prin această metodă sînt mai ridicate în raport cu celelalte metode.

Scanned with OKEN Scanner

— *metodele densimetrice* (metoda Philips şi van Slyke) sînt bazate pe măsurarea densităţii picăturilor de ser, lăsate să cadă într-o soluţie de sulfat de cupru de concentraţie (şi deci densitate) crescîndă. Metoda este interesantă pentru aplicare în condiţii de utilare minimă.

5.2.2. METODE DE SEPARARE ŞI CARACTERIZARE

5.2.2.1. *Metodele electroforetice* sînt aplicate cu succes pe scară largă pentru studiul amestecului de proteine plasmatice. Dintre cele două variante principale se utilizează mai ales electroforeza liberă sau frontală (Tiselius 1955) şi electroforeza de zonă. Aceasta din urmă s-a dovedit deosebit de utilă în investigaţiile medicale.

a) *Electroforeza de zonă. Principiul.* Viteza de migrare a particulelor (în cazul acesta, macromoleculele proteice) într-un cîmp electric este exprimată prin relaţia:

$$V = \frac{Q \times H}{6\pi\eta r}$$

în care:

$6\pi\eta r$ = măsură a rezistenţei prin frecare interioară (vîscozitate) a particulelor de rază r;

Q = încărcătura electrică a particulei. Este dependentă de pH-ul tamponului;

H = tăria cîmpului electric.

Tabelul XIV.2

Valori procentuale ale proteinelor plasmatice separate prin electroforeză de zonă

Fracţiunea	Procent relativ		Concentraţie absolută în g/100 ml ser cu 7 g proteine totale
	medie	limite	
Albumine	60	55—70	3,50—4,50
α_1-globuline	4	2— 5	0,14—0,35
α_2-globuline	8	5—10	0,35—0,70
β-globuline	12	10—15	0,70—1,05
γ-globuline	16	12—20	0,84—1,40

b) *Electroforeza pe hîrtie.* A fost varianta cea mai practicată, deşi în perspectivă se conturează înlocuirea hîrtiei cu foliile de acetat de celuloză. În tabelul XIV.2 sînt redate valorile procentuale ale proteinelor plasmatice separate prin electroforeză de zonă.*

c) *Electroforeza pe foi de acetat de celuloză.* Acestea sînt un suport mai omogen decît hîrtia şi separarea proteinelor poate fi făcută rapid cu folosirea unui volum foarte mic de ser (electroforeză de „microzonă"). Deşi numărul fracţiunilor separate este acelaşi cu cel obţinut pe hîrtie, procentajele reprezentînd concentraţia fracţiunilor proteice, sînt diferite de cele obţinute pe hîrtie şi amîndouă se deosebesc de cele obţinute prin electroforeza liberă (vezi datele medii din tabel).

d) *Electroforeza în gel de agar* sau *în agaroză* (agar transformat prin îndepărtarea grupărilor sulfurice şi a celei carboxilate). Agarul reprezintă un mediu bun, folosit din ce în ce mai mult pentru separarea proteinelor plas-

* Valorile diferă într-o anumită măsură în funcţie de natura suportului şi procedeul de colorare.

Scanned with OKEN Scanner

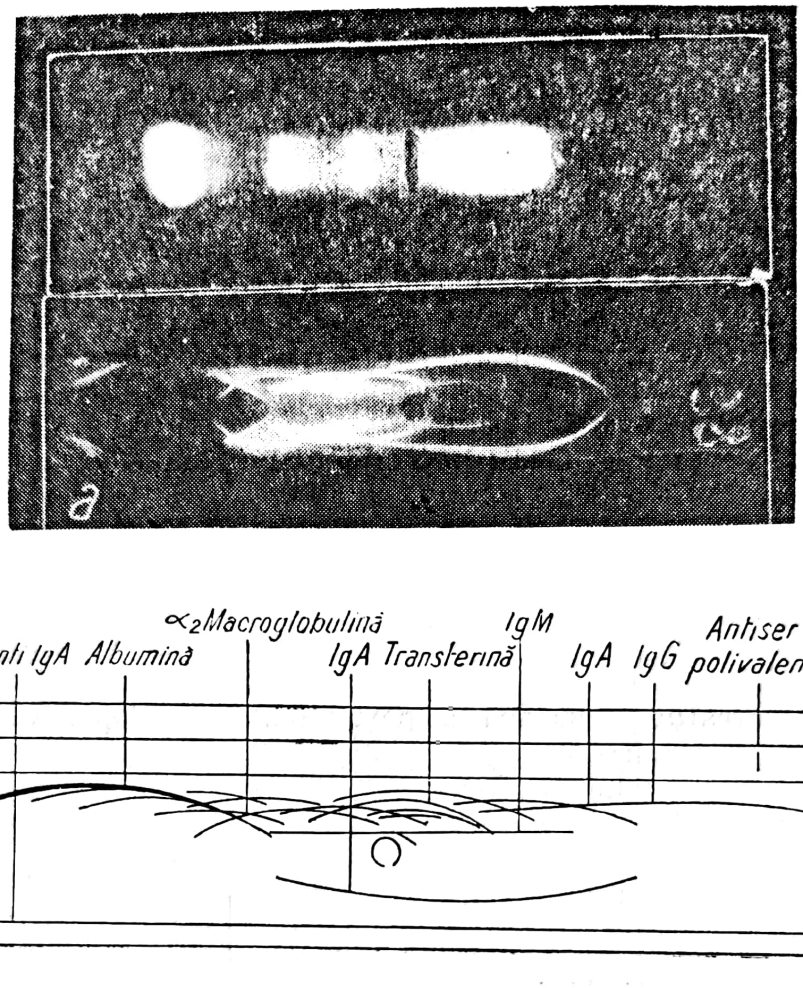


Fig. XIV.24. Imunoelectroforeza proteinelor plasmatice.

matice, urmată de colorare şi evaluare procentuală a fracţiunilor prin integrare. *Agaroza* este mediul preferenţial folosit pentru separarea lipoproteinelor.

Imunelectroforeza (Grabar şi Williams) constă din asocierea electroforezei în geloză cu imundifuzia radială. Se folosesc anticorpi precipitanţi polivalenţi sau mai ales monovalenţi (monospecifici).

Rezoluţia obţinută prin imunoelectroforeză a permis identificarea a 30 de fracţiuni proteice plasmatice şi precizări preţioase privind sistemul gamaglobuline IgG, IgA, IgM, IgD, IgE (fig. XIV.24). Marcarea anticorpilor cu radioizotopi sau cu enzime a adus un progres tehnic considerabil pentru dozările de antigene biologice în concentraţii foarte mici. Marcarea anticorpilor cu enzime a dus la aplicarea aşa-numitelor sisteme EISA (enzyme-immuno-sorbent ASSAY) şi ELISA (enzyme-linked-immuno-sorbent ASSAY).

e) *Electroforeza în geluri cu efect de „sită moleculară"* ca gelul de amidon şi de poliacrilamidă au adus contribuţii importante la studiul proteinelor plasmatice. În aceste geluri separarea se realizează nu numai în funcţie de sarcina electrică a particulei electrice, ci se asociază şi cu o fracţionare în funcţie de dimensiunea moleculară aflată în raport cu diametrul porilor din

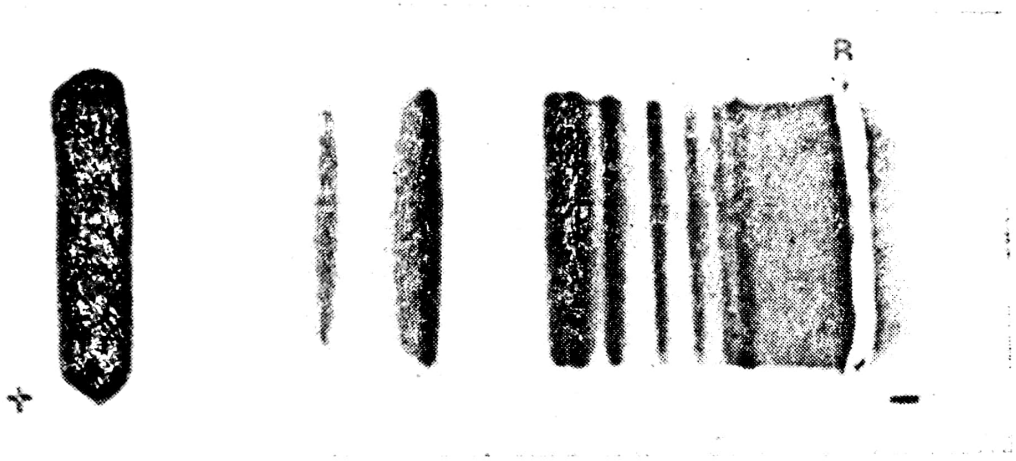


Fig. XIV.25. Electroforeza proteinelor plasmatice în gol de poliacrilamidă.

gel. Studiul heterogenității proteice—izoenzime, haptoglobine, transferine etc. — beneficiază de aplicarea electroforezei în gel de amidon. Gelul de amidon întîrzie migrarea electroforetică a proteinelor cu o greutate moleculară de 50 000 (α_2-macroglobuline). Detalii tehnice se găsesc în cărțile de metodologie și în special, în lucrările lui Smiethis.

f) *Electroforeza în gel de poliacrilamidă*, cu varianta sa cea mai aplicată „electroforeza în disc" a permis o rezoluție foarte fină a fracțiunilor proteice studiate (fig. XIV.25).

g) Variantele mai noi metodologice ca *focalizarea izoelectrică* (izoelectric focusing) și *izotahoforeza* nu au încă aplicare curentă. Combinația între electroforeză și cromatografie — *electrocromatografia* — a permis studiul „amprentelor peptidice", obținute prin hidroliza proteinelor (metoda „finger printing" a lui Ingram).

5.2.2.2. *Metodele cromatografice* au aplicare pe scară largă și sînt realizate sub formă de separări pe coloane de DEAE celuloză, sau filtrare în gel de sephadex. Mai recent, ele sînt utilizate sub formă de cromatografie de afinitate ce permite aprofundarea investigațiilor referitoare la proteinele plasmatice și alte proteine cu activitate biologic-specifică.

5.2.2.3. *Ultracentrifugarea* (*Svedberg*) a permis caracterizarea proteinelor plasmatice prin constanta lor de sedimentare (capitolul III).

5.2.2.4. *Precipitare cu soluții saline*, s-a aplicat cu următoarele săruri: Na_2SO_4, $MgSO_4$, amestec de fosfați mono- și dipotasici și mai ales prin utilizare de $(NH_4)_2SO_4$. Toate aceste săruri se folosesc și pentru purificarea proteinelor plasmatice. Globulinele precipită la semisaturare în sulfat de amoniu, iar albuminele la o concentrație superioară celei de 50% din concentrația de saturare.

5.2.2.5. *Separarea prin solvenți organici, la rece* — acetonă, eter, metanol, dar mai cu seamă cu etanol, a condus la precizarea metodei Cohn a cărei aplicabilitate are o deosebit de mare importanță practică. Scăderea selectivă a solubilității proteinelor prin variate concentrații de alcool, tărie ionică și pH au permis separarea a cinci fracțiuni prezentate cu conținutul lor în tabelul XIV.3. Pentru aprofundarea datelor de structură, ca pentru orice

Scanned with OKEN Scanner

Tabelul XIV.3

Fracţiunile proteice plasmatice separate prin metoda Cohn (cu etanol, la rece):

Fracţiunea		Componente
I		61% fibrinogen (I), Orotrombina (III), Proaccelerina (V), Convertina (VII), Factorul antihemofilic (VIII) Aplicaţii terapeutice posibile: Afibrinogenemia, Hipoprotrombinemia, Hemofilia
II		98% γ-globuline, anticorpi *Aplicaţii terapeutice posibile*: Agamaglobulinemia, imunizare pasivă
III	Subfracţia III_0	β-globuline (β-lipoproteine)
	Subfracţia III_1	β-globuline (izoaglutinine anti A, anti B, anti Rh)
	Subfracţia III_2	β-globuline, complement (parţial)
	Subfracţia III_3	β-globuline, α-globuline (plasminogen)
IV	Subfracţia IV_1	α-globuline (α-lipoproteine, ceruloplasmină)
	Subfracţia IV_4	α-globuline (hormon tireotrop)
	Subfracţia IV_6	α-globuline (esteraze, hipertensinogen, iodoproteine, α_2-glicoproteine)
	Subfracţia IV_7	β-globuline (siderofilină)
V	Albumină serică	*Aplicaţii terapeutice* ca substituent plasmatic
VI	Preponderent ioni şi orozomucoid	

proteine, se determină secvenţialitatea aminoacizilor, se aplică analiza spectrelor de difracţie cu raze X, se cercetează dispersia optică rotatorie şi dicroismul circular (detalii capitolul III).

5.2.2.6. *Testele de floculare nespecifice* se bazează pe alterarea echilibrului coloidal (teste de labilitate serică proteică) al proteinelor serice, determinînd apariţia unei turbidităţi în prezenţa anumitor reactivi. Turbiditatea se apreciază în raport cu o scară de etaloane. Dintre cele mai cunoscute şi mult aplicate sînt: reacţia timol (Mac Lagen — valori normale 0—4 U Mc Lagen $\pm$ $\pm$2 DS); reacţia Kunkel sulfat de zinc (valori normale 4—12 U Shank-Hoagland $\pm$2 DS) şi reacţia Takata Ara simplificată, varianta cu folosirea unui singur tub, aprecierea făcîndu-se în valori de transmisie sau turbiditate (valori normale în procente de transmisie 100%—80%). Reacţiile cu sulfat de zinc şi Takata Ara sînt indicatori ai creşterii gamaglobulinelor plasmatice permiţînd într-o anumită măsură triajul solicitărilor de electroforeză pe hîrtie în seruri în care se bănuieşte creşterea gamaglobulinelor. În mecanismul pozitivării reacţiei timol din sistemul gama pare să intervină numai IgM; sînt implicate în mod special, fracţiunile β- şi α_2-globulina alcalină. Precipitatul obţinut din ser cu reacţie timol pozitivă este foarte bogat în fosfatide.

Scanned with OKEN Scanner

5.3. PRINCIPALELE PROTEINE PLASMATICE

Acestea sînt redate cu caracteristicile lor funcţionale specifice obţinute prin combinarea metodelor prezentate, în tabelul XIV.4.

Din totalul acestor fracţiuni o parte — imunoglobulinele, factorii de apărare nespecifică, cît şi factorii coagulării — sînt prezentate separat.

În tabel nu au fost încadrate unele componente prezente în ser, în concentraţii încă necunoscute precis la normali, dar care au totuşi o importanţă biologică şi anume:

Gc-globulina sau componentul specific de grup sanguin, glicoproteină în greutate moleculară de 50 000 daltoni şi concentraţie serică de 40 ny % valoare medie. Ea scade în afecţiunile hepatice grave.

Eritropoietina în greutate moleculară de 30 000 daltoni cu implicaţii în hematopoieză.

Proteina C reactivă în greutate moleculară 135 000—140 000 daltoni, prezentă în ser sub 1—2 mg %, cu creşteri foarte mari în stările inflamatorii acute. Prezenţa sa favorizează fagocitoza.

β_2-*glicoproteina* cu greutate moleculară 40 000 daltoni, avînd concentraţia serică medie 20 mg%; se cunoaşte deficitul familial de β_2-glicoproteine.

β_2-*microglobulinele* în greutate moleculară de 11 600 daltoni avînd concentraţia serică de 0,15 mg %, sînt din ce în ce mai cercetate pentru implicaţiile pe care le au în sistemul de histocompatibilitate majoră şi pentru variaţiile semnificative pe care le înregistrează în patologia renală.

În cele ce urmează vor fi prezentate principalele proteine plasmatice despre care nu s-au făcut anterior menţionări speciale.

5.3.1. ALBUMINA

Este o componentă majoră a proteinelor plasmatice, reprezentînd procentual 55—60% din totalul lor. Nivelul său plasmatic la normal este cuprins între 3,5 g şi 4,5 g %; are formă moleculară elipsoidală cu greutate moleculară 65 000—69 000 daltoni şi T/2 17—27 de zile. Serumalbumina este sintetizată în ficat; producţia zilnică de 120—150 mg/kilocorp. În urma lucrărilor lui Brown s-au definitivat datele structurale asupra acestei albumine. Ea are cel mai lung lanţ peptidic cunoscut — peste 580 aminoacizi —. Dintre aceştia predomină: acidul glutamic (83 resturi), acidul aspartic (55 resturi), lizină (59 resturi), valină (46 resturi), leucină (73 resturi). Aminoacidul N-terminal este acidul aspartic, iar în C-terminal este leucina. Albumina serică este alcătuită dintr-o serie de nouă ochiuri de reţea închise de punţi disulfurice (fig. XIV.26), posedă şi un grup tiol liber ce permite formarea complexelor cu metale ca: Hg, Zn, Ag, Cu. Ochiurile acestea de reţea se asociază în trei domenii similare, cele duble fiind conectate între ele într-o catenă peptidică unică. Datorită unei asemenea construcţii spaţiale, albumina are flexibilitate cu totul remarcabilă. Deşi Brown găseşte analogii structurale între albumină şi imunoglobulină IgG, el atrage atenţia şi asupra unor trăsături prin care albumina se aseamănă cu mioglobina; în special, în secvenţa Arg-His-Pro, găsită în ochiurile 3 şi 6 ale albuminei şi în helixul G al mioglobinei. Foarte interesantă din punct de vedere biologico-medical este omologia între ochiurile 4 şi 5 ale albuminei şi α_1-*feto proteina* (o α_1-globulina) produsă în cursul vieţii

Scanned with OKEN Scanner

Fracțiunile proteice plasmatice clasificate pe funcțiuni *Tabelul XIX.4*

Nr. ord.*	Denumirea	Greutatea moleculară în daltoni	Peptide %	Concentrația plasmatică mg%		Funcțiuni biologice particulare și alte caracteristici	Modificări patologice dobîndite sau înnăscute, în:
				medie	limite		
1	2	3	4	5	6	7	8
	I. *Proteine de transport*						
2	Prealbumina	50 000	99	25	10—40	fixare, transport: tiroxina retinolul	afecțiuni hepatice grave
1	Albumina	65 000—69 000	100	4 400	3 500—5 500	fixare, transport: acizi grași pigmenți ioni medicamente; presiune coloid-osmotică, rezervă proteică	ciroze nefroze analbuminemie
10	α_1-Lipoproteina (HDL)	180 000—350 000	42—55	360	290—770	fixare, transport: lipide, hormoni	afecțiuni hepatice boala Tangier
14	Transcortina	45 000	86	7	—	fixare, transport: cortizol	ciroze, nefroze
20	Globulina fixatoare de tiroxină	36 000—45 000	85	1—2	—	fixare, transport: tiroxina	deficit ereditar
	Proteina fixatoare de retinol	21 000	100	4	3—6	fixare, transport: vitamina A	
	Transcobal-amina I	56 000	—	—	—	fixare, transport: cobalamină (vitamina B_{12})	

* Numărul de ordine corespunde clasificației Schultze-Heremans.

Scanned with OKEN Scanner

	α_2-Globulina fixatoare de urat	67 000	88	—	—	fixare, transport: urat	
30	Haptoglobina tip 1-2 „ 2-1 „ 2-2	100 000	81	170 235 190	100—200 160—300 120—260	combinat cu HGB proprietăţi peroxidazice	afecţiuni hepatice anemie hemolitică afecţiuni inflamatorii hipohepatoglobulinemie
60	β-Lipoproteina	2 400 000— 3 200 000	22	400	300—700	fixare, transport: lipide	nefroze A- -lipoproteinemie
	β-Globulina fixatoare de steroizi	65 000	88	—	0,1—1,5	fixare, transport: 17- hidroxizi steroizi	sarcină
64	Hemopexina β globulina)	57 000— 80 000	77	75	50—115	fixare, transport: hemul	anemie hemolitică
61	β_1-Transferina (siderofilina)	80 000	95	295	200—400	fixare, transport: fier	nefroze tumori maligne stări inflamatorii
				II. Inhibitori enzimatici			
12	α_1-Antitripsina	54 000	87	290	200—400	inhibare: proteaze (tripsină, chimotripsină)	afecţiuni inflamatorii hipo-α_1-antitripsinemie în emfizem prematur
22	α_1-Antichimotripsina	68 000	73	45	30—60	inhibare: chimotripsina	
	Antitrombina III	65 000	85	23	17—30	inhibare: trombina	afecţiuni hepatice, după contraceptive orale

Scanned with OKEN Scanner

Tabelul XIX.4 (continuare)

1	2	3	4	5	6	7	8
37	α_2-Neuramino glicoproteina (inhibitor al Cl-esterazei)	104 000	57	24	15—30	inhibare: C.1 r C.1 s al plasminogenului, al calicreinei, al factorului XII	edem angioneurotic
33	α_2-Macroglobulina	820 000	92	240	150—400	inhibare: proteaze (plasmină)	sindrom nefrotic afecţiuni hepatice diabet
	III. *Enzime*						
31	Ceruloplasmina	132 000	89	35	15—60	proprietăţi oxidazice	boala Wilson neoplazie sarcină
	Componentul Cls al complementului (Cl-esteraza)	86 200	—	3	2—4	esteraza	
32	Pseudocolinesteraza	348 000	76	1	0,5—1,5	scindarea esterilor colinei	afecţiuni hepatice, afecţiuni de nutriţie, diabet, nefroză, hiperlipemie
	Lizozim (muramidaza)	15 000	100	—	0,07—0,20	bacterioliză	leucemie monocitară nefropatii
	IV. *Factorii coagulării şi fibrinolizei*						
	Protrombine Factor II al coagulării	72 000	—	—	5—10	profactor al trombinei	afecţiuni hepatice, tratament anticoagulant

Scanned with OKEN Scanner

81	Plasminogen (Profibrinolizina)	81 000	—	12	6—25	proenzimă a plasminei (proactivator)	fibrinolize
80	Fibrinogen Factor I al coagulării	341 000	97	300	200—450	proteină coagulabilă	leziuni hepatice hiperfibrinolize, afibrinogenemie
	Antigen AHG Factor VIII al coagulării	1—2 mil.	—	—	1	transport Factorul VIII Factor Willebrand	sindrom Willebrand-Jürgens
	Factor de stabilizare al fibrinei Factor XIII al coagulării	340 000	95	—	1—4 (fracțiunea S)	polimerizarea fibrinei (transamidază)	întîrzieri de cicatrizare
	V. *Constituenții complementului*						
	Constituent C. 9	79 000	—	4,5	2—7	activ în sistemul complement	
	Constituent C.1 r	150 000	—	10	—	activ în sistemul complement	boli autoimune deficit ereditar C_2
	Constituent C.2	117 000	—	—	1—3	activ în sistemul complement	boli autoimune (glomerulonefrite, lupus eritematos)
63	Constituent C.3 (β_1-C-Globulină)	185 000	97	82	55—120	convertit în ser în C3 a (anafilatoxină) C3 c (β_1-A-globulină) C3 d (α_2-D-globulină)	lupus eritematos
	Constituent C.4 (β_1-E-Globulina)	230 000	—	30	20—50	activ în sistemul complement	
	Constituent C.5 (β_1-F-globulina)	200 000	81	8	4—15	convertit în ser în C5 a (anafilatoxină)	

Scanned with OKEN Scanner

Tabelul XIX.4 (continuare)

1	2	3	4	5	6	7	8
	Constituent C.3 pro-activator (factor B-properdină)	80 000	89	18	10—40	proenzimă a activatorului C3 (β_2-glicoproteină II)	
	Constituent C.1 q	400 000	90	19	10—25	fracţiunea C_1	lupus eritematos
	Constituent C.6	95 000	—	—	1—7	activ în sistemul complement	
	Constituent C.7	100 000	—	—	—	activ în sistemul complement	
	Constitutent C.8	153 000	—	—	—	activ în sistemul complement	
	Properdina	184 000	—	—	—	activarea complementului (calea alternă)	
	VI. *Imunoglobuline*						
90	IgG (γG-; γ_2-/ 7S-γ-globuline)	150 000	97	1 250	800— 1 800	anticorp	afecţiuni hepatice infecţiuni cronice mieloame sindrom carenţă anticorpi
	IgA (γA-; γ_1A-, β_2A-globuline)	160 000 şi polimeri	92	210	90—450	anticorpi în special în secreţii	ciroze infecţiuni cronice mieloame sindrom carenţă anticorpi ataxie-telangiectazie
91	IgM (γM-; β_2M-, 19 S-γ-globuline)	900 000	89	150	60—280	anticorpi (izoaglutinine)	infecţii cronice (tripanosomiază etc.) macroglobulinemia lui Waldenström afecţiuni hepatice sindrom carenţă anticorpi mielom
93	IgD (-D-globuline)	170 000	88	—	—	anticorpi	mielom
	IgE (E-globuline)	190 000	89	—	—	anticorpi (reagine)	mielom boli alergice parazitoze

Scanned with OKEN Scanner

fetale, înaintea albuminei şi în ficatul adult neoplazic (hematom primar). Prin tratare cu enzime proteolitice — tripsină, pepsină — s-au obţinut fragmente ce conţin cele 9 ochiuri ale albuminei. Fragmentele îşi păstrează conformaţia şi în proporţie de 50% au structură α-helicoidală. Albumina îndeplineşte două funcţii principale în plasmă: asigură — preponderent presiunea coloid-osmotică a plasmei şi transportă o mare variatate de componente (ioni anorganici şi organici, acizi graşi, acid uric, vitamine hormoni, coloranţi, pigmenţi biliari). În urma lucrărilor lui Brown s-au determinat domeniile din lanţul peptidic la nivelul cărora se leagă acizii graşi şi bilirubina (ochiurile 4 şi 5). Tot la nivelul ochiurilor 4—5 se leagă şi unii coloranţi ca verdele de brom crezol utilizat într-o recentă metodă aplicată pentru dozarea colorimetrică a albuminei. Această metodă a fost introdusă de curînd şi în tehnicile automatizate. Competiţia de legare a componentelor globulinice cu colorantul nu se face simţită în primele 6—30 secunde, ceea ce impune ca citirea să se facă imediat după contactul reactivului cu mediul ce conţine albumina. În patologie se cunosc hipoalbuminemii (ciroze hepatice, nefroze). Ca anomalii genetice se cunosc analbuminemia (rară) şi bis-albuminemia (dedublare) cu caracter familial.

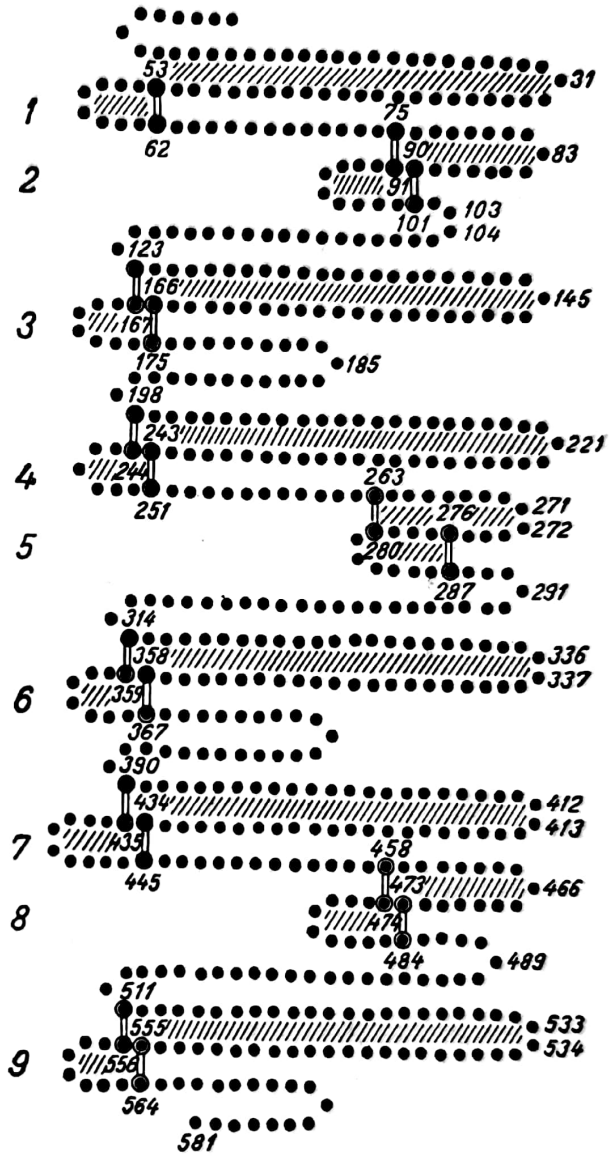


Fig. XIV.26. Structura primară a albuminei (după Brown).

5.3.2. GLICOPROTEINELE PLASMATICE

Acestea sînt componente proteice cu mobilitate electroforetică α, β-globulinică, la care se adaugă imunoglobulinele din sistemul γ. Ele conţin proporţii variate între 3—30% glucide-hexoze, hexozamine, acid sialic, fucoză, legate covalent cu lanţul protidic prin legătura de tip imino-eter (glicozil-aminil).

5.3.2.1. α_1-*Globulinele.* a) *Fracţiunea sero mucoizilor* cu mobilitate electroforetică α_1-globulinică nu poate fi precipitată prin acid tricloracetic, percloric sau sulfosalicilic ci numai prin acid fosfotungstic. Dintre seromucoizi, cel mai important este orozomucoidul lui Winzler sau seromucoidul percloro-solubil, sinonim cu α_1-glicoproteina acidă a lui Schmid. Acesta are greutate moleculară 41 000 daltoni; componenta glucidică reprezentînd 40% din

greutatea sa totală. Conţine D-manoză, D-galactoză, N-acetil-glucozamină, L-fucoză şi acid N-acetil-neuraminic. El conţine un singur lanţ peptidic cu acidul piroglutamic ca aminoacid N-terminal şi cu serina ca aminoacid C-terminal. În patologie a fost studiată creşterea orozomucoidului, în special în reumatismul poliarticular acut.

b) α_1-*antitripsina*, glicoproteină cu greutate moleculară 53 000 daltoni, are mai multe forme moleculare, dovedind heterogenitatea sa. Proteina este inhibitor natural al proteazelor, deoarece pe lîngă tripsină inhibă şi chimotripsina, calicreina şi plasminele. Se dozează fie imunochimic, fie prin măsurarea acţiunii inhibitoare asupra tripsinei, cu N-benzoil-arginin-paranitroanilidă ca substrat. Concentraţia normală în ser este de 2—6 g/l. În patologie se cunosc creşteri provocate prin inflamaţii şi distrugerea celulelor. Deficitul ereditar de α_1-antitripsină (Laurell-Eriksson — 1963), se transmite recesiv- autosomal. Proteina este implicată în afecţiuni respiratorii şi în special, în apariţia emfizemului pulmonar manifestat de timpuriu. Se consideră că deficitul de antiprotează ar face ca unele ţesuturi — parenchimul pulmonar de exemplu — să fie foarte sensibil la acţiunea tripsinei leucocitare, infecţiile bronhopulmonare, determinînd local un aflux de leucocite.

c) α_1-*fetoproteina* cu greutate moleculară 65 000 daltoni se formează în ficat şi tractusul intestinal. Se dozează imunologic, radioimunologic şi enzimoimunologic. Normal are concentraţia de 10 μg/litru de ser. Valoarea diagnostică pentru hepatom este legată de creşteri de pînă la 2 mg/l. Creşterea α_1-fetoproteinei în lichidul amniotic şi sîngele matern se produce în cazul de anencefalie şi spina bifida.

5.3.2.2. α_2-*Globulina*. a) α_2-*macroglobulina* cu greutate moleculară 725 000—850 000 este inhibitor natural al proteazelor. Se dozează imunochimic, valorile normale fiind 1,5—4,2 g/l plasmă. α_2-macroglobulina poate atinge nivelul de 20—30 g/l în nefroza lipoidică pură a copilului, în schimb, concentraţia sa scade în artrita reumatoidă.

b) *Haptoglobinele*. Există trei fenotipuri majore de haptoglobină umană H_p1-1; H_p2-1; H_p2-2, ce se pun în evidenţă uşor prin electroforeză în gel de amidon, varianta verticală. Complexul hemoglobină-haptoglobină se comportă ca o peroxidază, proprietate care a condus la descoperirea haptoglobinei în 1938 (Polonowski-Jayle). Complexul H_p—HGB este distrus la nivelul SRH. Legătura dintre haptoglobină (HP) şi hemoglobină (HGB) se stabileşte prin forţe Van der Waals cu globina şi nu cu hemul. Stabilirea acestei legături face să se piardă alura sigmoidală a curbei de disociere a HGB—O_2 şi suprimă efectul Bohr asupra acesteia. Prin studii de clivaj reductiv cu mercaptoetanol şi uree a diferitelor haptoglobine, cu ruperea punţilor disulfurice, s-au obţinut două feluri de lanţuri peptidice α (greutate moleculară 9 000) şi β (greutate moleculară 42 000). Acesta din urmă este comun tuturor tipurilor de haptoglobine. Lanţurile α diferă cu tipul căreia îi aparţin. Se pot detecta lanţuri cu mobilitate electroforetică rapidă (F=fast) şi lanţuri cu mobilitate electroforetică lentă (S=slow). Toate lanţurile au ca secvenţă N-terminală valina-leucina iar ca secvenţă C-terminală izoleucina-acid glutamic. Diferenţa între mobilităţile fracţiunilor F şi S rezultă din substituţia neconservativă a aminoacizilor.

Haptoglobinele sînt folosite în studii de genetică a populaţiei. Se dozează prin imunodifuzie radială sau prin activarea capacităţii pseudo-peroxidazice a HGB. Valorile normale sînt cuprinse între 0,5 şi 3,5 g/l. Se produc scăderi

Scanned with OKEN Scanner

în bolile hepatice și anemii hemolitice și creșteri în inflamațiile acute, procese neoplazice, limfogranulomatoză malignă și diabet zaharat.

c) *Ceruloplasmina* (cupro-oxidaza sau fero-oxidaza) este o metalglicoproteină, cu greutate moleculară 130 000—160 000, cu mobilitate de α_2-globulină. Este principalul conținător de cupru din plasmă. Molecula de ceruloplasmină are un conținut de 0,32% Cu din greutatea totală a acestei metalproteine. Fiziologic intervine în oxidarea Fe^{2+} la Fe^{3+}, fiind implicată în metabolismul transferinei. După Bromann, cei opt atomi de Cu din molecula de ceruloplasmină ar fi transferați către citocromoxidază, în cursul sintezei intracelulare a acesteia. S-au discutat și implicațiile ceruloplasminei în metabolismul aminelor biogene, în special, în oxidarea hidroxitriptaminei. În electroforegramă activitatea ceruloplasminei se vizualizează prin oxidarea parafenilendiaminei cu producere de compuși chinoizi sau a ionului Fe^{2+} în Fe^{3+} ca precipitat de ferocianură ferică. Din punct de vedere structural, s-ar părea că ea este un octomer, cu formula moleculară $\alpha_4\beta_4$, în care α și β sînt subunități peptidice cu greutate moleculară de 17 000 daltoni, avînd ușoare diferențe de sarcină electrică. S-au descris șapte fenotipuri de ceruloplasmină. Se dozează imunochimic sau colorimetric cu parafenilendiamină, N-dimetilparafenilendiamină sau ortodianizidină ca substrat. Cea mai importantă variație patologică a sa este cunoscută în boala Wilson sau degenerescența hepato lenticulară. Se cunosc și creșteri reactive nespecifice în procese inflamatorii și maligne, în special în limfogranulomatoza malignă.

Cercetări recente (1977) au reactualizat interesul pentru glicoproteinele plasmatice, corelîndu-le variația cu aceea a factorilor de risc de natură lipidică în aterogeneză. S-au semnalat în coronaropatii creșteri semnificative ale următorilor factori: haptoglobină C 3c, G_c globulină, G_c α_1-glicoproteină și a activatorului C_3.

5.3.2.3. β-*globulinele*. β_1-Transferina (siderofilina) este transportorul de Fe plasmatic, cu mobilitate electroforetică de β_1-globulină. Conține Fe 0,13% din greutatea sa, are greutate moleculară aproximativ 89 000 daltoni. Componenta heterozaharidică este legată de cea peptidică printr-o legătură glicozilaminil. Se cunosc mai multe forme moleculare ale transferinei genetic determinate. Dintre acestea, mai cunoscute sînt trei tipuri: transferina C cea mai răspîndită la toate populațiile necolorate, transferinele de tip B (B_0, B_1, B_2), electroforetic mai rapide decît forma C și transferinele D (D_0, D_1, D_2, D_3) electroforetic mai lente, întîlnite — în special — la populațiile de culoare (neagră, galbenă). Transferinele sînt sintetizate mai ales în ficat, probabil și în splină, ganglioni limfatici și ileon. În mediu neutru transferina poate fixa doi atomi de Fe/moleculă. La situsul de legare se activează resturile tirozil, la care se adaugă, după unele cercetări și participarea a două grupări imidazol din histidină). Complexul este stabil în zona de pH 7,5—10 și se disociază la pH 4. Transferina se încarcă cu Fe ionizat provenit din mucoasa intestinală sau din organele de depozitare ale metalului (ficat și alte țesuturi). În mod normal numai 1/3 din transferină este saturată cu Fe. Nivelul normal al sideremiei corespunde acestei încărcături cu Fe a transferinei circulante. Nivelul sideremiei variază între 70—170 γ% pentru bărbați, cu valoare medie 120 γ%. La femei, valorile sînt cu 10% mai mici. În biochimia medicală aprecieri asupra capacității transferinei de a lega fierul sînt necesare diagnosticului

Scanned with OKEN Scanner

şi terapiei (în anemiile hipocrome, în special). În aceste cazuri este vorba de următoarele valori:

— capacitatea latentă de legare a fierului în transferină (IBC = iron binding capacity) corespunzătoare cantităţii de Fe necesară pentru a satura capacitatea de fixare a acestui metal pe transferină;

— capacitatea totală de legare a fierului în transferină (TIBC = total iron binding capacity) se obţine prin însumarea fierului seric (sideremiei) cu valoarea capacităţii latente de fixare a fierului în transferină;

— coeficientul de saturaţie este reprezentat prin raportul Fe^{2+} seric/capacitate totală de legare a Fe avînd valoarea 40% la bărbaţi şi 35% la femei.

Valori normale IBC:

bărbat 180—285 μg/100 ml ser
femei 150—250 μg/100 ml ser

Aceleaşi valori exprimate în micromoli sînt:

bărbaţi 32,24—50,15 micromoli Fe/l
femei 26,86—44,77 micromoli Fe/l

Valori normale TIBC:

bărbaţi 300—400 μg Fe/100 ml ser
femei 250—350 μg Fe/100 ml ser

În micromoli:

bărbaţi 53,73—71,9 micromoli Fe/l
femei 44,77—62,96 micromoli Fe/l.

Dozarea transferinei se face direct, imunologic (metoda Mancini) sau indirect din capacitatea totală de legare a fierului.

În tabelul XIV.5 sînt redate principalele variaţii patologice ale sideremiei şi capacităţii totale de legare a Fe în transferină.

Tabelul XIV.5

Variaţii patologice ale sideremiei

Stare patologică	Fe seric	Capacitatea totală de legare a Fe în transferină	Coeficientul de saturaţie al siderofilinei
Anemie feriprivă	−	+ +	− (<10%)
Hemoragie acută	− −	+	−
Anemie hemolitică	+	−	+
Anemie pernicioasă	+	−	+
Hemocromatoze	+ +	−	+ + (cca 100%)
Hemosideroze transfuzionale	+ +	−	+ + (cca 80%)
Hepatită icterigenă	+	normal	+

5.4. LIPIDELE ŞI LIPOPROTEINELE PLASMATICE (SAU SERICE)

Acestea sînt substanţe insolubile în apă; lipidele polare se asociază cu anumite proteine specifice, dintre care cele mai bine cunoscute sînt lipoproteinele de transport din plasma sanguină a mamiferelor (cenapsele lipoproteice

Scanned with OKEN Scanner

ale lui Macheboeuf). Aceste proteine conjugate iau naştere prin interacţiile necovalente dintre lipide şi lanţurile peptidice. Lipoproteinele sînt, în esenţă, transportori de lipide şi de substanţe liposolubile. Ele conţin de obicei lipide polare şi neutre, precum şi colesterol liber şi esterificat. Fosfolipidele care sînt molecule amfiliofile, bogate în funcţii polare, servesc drept legătură între componentele neutre (steroli, steride, gliceride) şi proteine. Lecitinele asociază lanţurile hidrofobe cu moleculele de colesterol, iar prin componentele polare, hidrofile — colină, acid fosforic, stabilesc legături cu funcţiile polare din proteine. Componentele hidrofile — fosfolipide şi lanţuri peptidice — sînt îndreptate către suprafaţa complexului lipoproteic venind în contact cu mediul apos iar componentele hidrofobe — trigliceride — sînt dirijate către interior. Fosfolipidele colinice se leagă în complexul lipoproteic atît prin legături electrostatice între funcţiile polare cu semn contrar — cît şi prin interacţii hidrofobe cu partea nepolară a proteinelor. Trigliceridele, steridele şi colesterolul sînt legate cu lanţurile hidrofobe ale fosfolipidelor. În fig. XIV.27 este redat după Van den Heuvel, un model posibil al lipoproteinelor cu densitate mică (LDL).

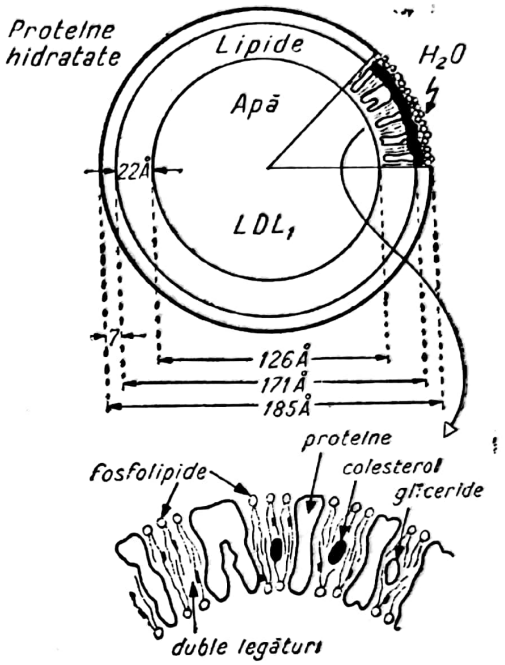


Fig. XIV.27. Model posibil al lipoproteinelor serice (după Van den Heuvel, adaptat).

5.4.1. COMPONENTELE LIPIDICE

Clasificarea şi compoziţia lipoproteinelor plasmatice cît şi dislipidemiile au fost prezentate în capitolul X. Se reaminteşte că plasma conţine în medie 700 mg/l sau 9,13 mol/l lipide totale, din care: fosfolipide 35%, gliceride — preponderent trigliceride — 10—25%, în medie 15,9%; colesterol liber 7,5%, colesterol esterificat 39,1% şi acizi graşi 2,5%.

Dozarea lipidelor totale în laboratorul clinic se face curent colorimetric, pe baza formării complexului de culoare fosfovanilinosulfonic. Se practică mai rar metode gravimetrice şi metode bazate pe absorbţia unor coloranţi de către lipidele depuse pe hîrtie, urmată de eluţie şi colorimetrare. Se vor expune mai departe date referitoare la principalele componente lipidice plasmatice, cu accentul pe metodică şi valorificarea clinică a rezultatelor.

5.4.1.1. *Fosfolipidele plasmatice.* Acestea sînt preponderent fosfatidil coline (lecitine). Ele reprezintă 66% din ansamblul fosfolipidelor (vehiculate în plasmă în fracţiunea lipoproteine — H.D.L.). În rest sînt cuprinse: sfingomieline (20%), ansamblul lizolecitine, cefaline, inozitide (10%); plasmalogene sau acetalfosfatide (4%); fosfatidil-serină (3%). După modelul structural prezentat mai înainte, fosfatidele ar juca în plasmă un rol analog celui pe care îl au în membranele celulare. Sînt sintetizate, în special, în ficat. În

a doua jumătate a sarcinii, celulele alveolare pulmonare ale fătului sintetizează fosfatide, care au rol antiatelectatic. Raportul fosfatidilcolină/sfingomielină în lichidul amniotic cu valoare mai mare de 1,5 este în prezent un indicator studiat pentru diagnosticul prenatal al unor vicii ereditare în domeniul aparatului respirator. Acizii graşi care intră în compoziţia fosfatidelor sînt următorii: acizi graşi saturaţi (acid palmitic şi stearic) 46%, acid oleic şi palmitoleic 24%, acid arahidonic 8%.

Metoda de dozare cea mai folosită se bazează pe determinarea fotocolorimetrică a fosforului, cu formare de albastru de molibden (după mineralizare). Valori normale: 1,5—2,5 g/l (după unii autori 3 g/l), corespunzînd la 60 mg—100 mg P lipidic/l. Pentru caracterizare, fosfatidele se separă prin cromatografie în strat subţire: vizualizarea se face cu ninhidrină (pentru fosfatidele cu grupări NH_2) şi cu reactiv Dragendorff—KI, nitrat de bismut, NO_3H— (pentru cele care conţin colină).

Hiperfosfatidemia este caracteristică cirozei biliare, însoţită de o reducere a raportului colesterol/fosfatide. Valori crescute se întîlnesc de asemenea în hiperlipemia esenţială, hiperlipemia pancreatică, diabetul zaharat sever, nefroza lipoidică, icterul obstructiv, hipercolesterolemia esenţială, coma hepatică, hipotiroidism, glicogenoza Von Gierke.

5.4.1.2. *Colesterolul liber şi esterificat* este sintetizat principal în ficat, fiind vehiculat în plasmă în fracţiunea de densitate uşoară — L.D.L. — şi de mobilitate electroforetică β. Colesterolul plasmatic este în echilibru cu cel conţinut în celule, organismul uman conţinînd cca 2 g colesterol/kg greutate corporală. Majoritatea colesterolului (2/3 din cantitatea totală este endogen, provenind din biosinteză şi numai 1/3 este exogen, de origine alimentară. Esterificarea colesterolului se face în ficat şi în plasmă. Esterificarea plasmatică este catalizată de lecitil-colesterol-aciltransferază (LCAT), pe seama fosfatidilcolinei din lipoproteinele cu densitate ridicată (HDL). Esterii de colesterol sînt incluşi la nivelul ficatului în lipoproteinele plasmatice cu densitate mică. Acizii graşi folosiţi în esterificarea colesterolului sînt, în ordinea concentraţiilor procentuale din steridele respective, următorii: acid linoleic (48%), acizi oleic şi palmitic (29%), acizi saturaţi, palmitic şi stearic (19%), acid arahidonic (4%).

Metodica de dozare este bazată principal pe colorimetrie, aplicîndu-se două principii de reacţie: reacţia Liebermann-Burchard — cu anhidridă acetică şi H_2SO_4 — şi reacţia Zak — cu clorură ferică şi acid sulfuric concentrat. În prima variantă principială — cea mai practicată — colesterolul dă un compus de culoare verde cu anhidrida acetică şi H_2SO_4, ce poate fi stabilizat prin acid sulfosalicilic, acid para-toluen sulfonic sau acid dimetilbenzensulfonic. Reacţia poate fi tulburată de apă, nitraţi, bromuri, acizi biliari, bilirubină, hemoglobină. Rezultatele obţinute prin reacţia cu $FeCl_3$ pot fi influenţate de aceiaşi factori.

În ultimii ani s-a introdus o metodă enzimatică, ce se finalizează printr-o reacţie de culoare (Enzimatischer Farb-Test). În acest procedeu colesterolul esterificat este hidrolizat prin colesterol-esterază. Colesterolul eliberat este oxidat prin colesteroloxidază în colestenon, cu formare de H_2O_2. Catalaza prezentă în sistem descompune H_2O_2 ce oxidează metanolul adăugat, în formaldehidă. Aceasta este transformată prin acetil-acetonă şi amoniac în 3,5-diacetil-1,4 dihidrolutidină galbenă (reacţia Hantzsh).

Scanned with OKEN Scanner

Se poate doza colesterolul liber, esterificat şi total. În practica obişnuită se dozează numai colesterolul total. Dozarea fracţiunii libere şi a celei esterificate a colesterolului se bazează pe precipitarea colesterolului liber cu digitononă, cu formarea unui compus 3β-hidroxisteroid. Colesterolul esterificat rămîne în soluţie. Dozarea se face printr-una din metodele indicate mai înainte.

Colesterolul seric total creşte în hipercolesterinemia esenţială cît şi în hiperlipidimia esenţială, icter obstructiv, sindrom nefrotic, diabet zaharat, hipotiroidism. Creşterea colesterolului seric este unul din principalii factori de risc în ateroscleroză. Incidenţa infarctului miocardic este mai mare la persoanele cu hipercolesterolemie şi la cele cu colesterol scăzut în fracţiunea HDL.

Colesterolul seric scade în afecţiuni hepatice severe (ciroză evolutivă, hipertiroidism şi malnutriţie). Raportul colesterol liber/colesterol esterificat creşte în afecţiuni hepatice grave. Trebuie subliniat faptul că valorile normale variază în funcţie de: metodă, sex, vîrstă, condiţie ecologică regională, alimentaţie, ritmicitate sezonieră şi circadiană. Limitele valorilor normale în funcţie de vîrstă sînt redate la cap. X. Valoarea medie normală pentru un adult între 40—60 ani este 220 mg+2 D.S.

5.4.1.3. *Trigliceridele plasmatice* sînt de origine dublă, alimentară, exogenă, în chilomicroni şi de origine endogenă, sintetică, înglobate fiind în fracţiunea lipoproteică a cărei densitate este foarte scăzută, pre-β-lipoproteine (VLDL). Acizii graşi care intră în compoziţia trigliceridelor plasmatice sînt: acizii graşi saturaţi (palmitic, stearic), 3,8%, acizi graşi nesaturaţi (oleic, palmitoleic) 45%, acid acid linoleic 14%, acid arahidonic 2%. Trigliceridele alimentare alcătuiesc 85—90% din compoziţia chilomicronilor. Serul ce conţine chilomicroni este tulbure sau lactescent, limpezindu-se în partea inferioară a coloanei de lichid, cu ridicarea chilomicronilor la partea superioară, la 4 C (smîntînire). Electroforetic, chilomicronii se situează în zona de start sau între acesta şi fracţiunea de mobilitate β. Serul normal nu conţine chilomicroni, pe nemîncate. Chilomicronii sînt prezenţi (pe nemîncate) în hiperlipoproteinemiile tip I şi V, precum şi în hiperlipoproteinemiile secundare din diabetul zaharat, sindromul nefrotic, pancreatită.

Trigliceridele de sinteză sînt încorporate pre-β-lipoproteine (VLDL), fiind prezente în cantitate mică în serul normal, pe nemîncate. Sînt crescute în hiperlipoproteinemiile de tipul II b şi IV din clasificaţia lui Fredrickson. În tipul III de hiperlipoproteinemie banda „β-largă" (broad β) este o fracţiune atipică de pre-β-lipoproteină, cu mobilitate de β.

Metoda de dozare. În general se aplică procedee colorimetrice, cu reactivi chimici nespecifici. În ultimii ani s-au introdus procedee enzimatice. Pentru practicarea primei grupe de tehnici, este obligatorie saponificarea în soluţie alcalină (cu KOH — de obicei), oxidarea glicerolului (curent cu periodat de sodiu), cu transformare în aldehidă formică, care este trecută apoi într-un compus colorat (cu acid cromotropic sau fenilhidrazină hidroclorică). În procedeele enzimatice sînt implicate patru trepte de reacţii şi anume:

$$\text{Trigliceride} \xrightarrow{\text{lipază}} \text{glicerol} + 3 \text{ molecule acizi graşi}$$

$$\text{Glicerol} + \text{ATP} \xrightarrow[\text{Mg++}]{\text{glicerolkinază}} \text{glicerol-3-fosfat} + \text{ADP}$$

$$\text{ADP} + \text{fosfoenol-piruvat} \xrightarrow[\text{Mg++}]{\text{piruvatkinază}} \text{ATP} + \text{piruvat}$$

$$\text{Piruvat} + \text{NADH} + \text{H}^{+} \xrightarrow{\text{LDH}} \text{L-lactat} + \text{NAD}.$$

Scanned with OKEN Scanner

Triglicéridele cresc în hiperlipemia esenţială, în tipul II b, IV şi V (din clasificaţia lui Fredrickson), în diabetul zaharat, sindromul nefrotic şi ciroza ficatului.

Valori normale $(\overline{X} + 2\,DS) = 50 - 150$ mg/100 ml.

5.4.1.4. *Acizii graşi liberi* circulă în plasmă legaţi de albumine. Sînt alcătuiţi din acizi graşi saturaţi (palmitic, stearic), 49%, acizi graşi nesaturaţi (oleic, palmitoleic), 38%, acid linoleic 10%, acid arahidonic 1,3%.

Pentru majoritatea organelor, acizii graşi liberi reprezintă, alături de glucoză, cel mai important substrat energetic.

Metodica de dozare. Se bazează pe colorimetrie (pentru acizii graşi cu un număr de atomi de C mai mare de 10) cu formarea de săpunuri de Cu; dozarea se efectuează cu dietilditiocarbamat de Na. Se poate aplica şi titrimetria (cu albastru de Nil sau β-metilumbeliferonă-fluorescenţă. Nu sînt prea des investigaţi în chimia clinică. Se admite în general că o singură determinare este lipsită de semnificaţie.

Valori normale: 15—25 mg/100 ml (sau 0,3—0,8 mmol/l).

4.4.2. SEPARAREA LIPOPROTEINELOR

Separarea lipoproteinelor — grupurile majore — se face prin procedeele următoare:

5.4.2.1. *Ultracentrifugare de flotaţie.* Metoda poate fi aplicată, după caz, în scop analitic sau preparativ. Lipoproteinele au o densitate foarte mică datorită constituenţilor lipidici ce intră în compoziţia lor. Majoritatea proteinelor serice au densitatea cuprinsă între 1,33 şi 1,35 iar lipoproteinele au densitatea mai mică de 1,21. Supunînd un ser a cărui densitate a fost stabilită la 1,20 la o forţă centrifugală intensă 100 000—200 000 g, lipoproteinele flotează la suprafaţă, în timp ce proteinele sedimentează. Fiecare moleculă lipoproteică este caracterizată printr-o constantă specifică de flotaţie notată cu S_f.

5.4.2.2. *Electroforeza de zonă.* În acest procedeu suportul de elecţie este agaroza. Mai înainte s-a practicat şi electroforeza pe hîrtie, dar în prezent este pe cale de a fi părăsită, datorită slabei sale calităţi rezolutive pentru lipoproteine. La fel şi electroforeza în gel de agar-agaroză sau de poliacrilamidă. Este de subliniat totuşi faptul că în 1967 Fredrickson a stabilit, pe baza electroforezei pe hîrtie, clasificarea hiperlipoproteinemiilor, în cele cinci tipuri menţinute şi azi la baza investigaţiilor şi tratamentului privind dislipidemiile. Folosind soluţii tampon cu albumină umană sau bovină 1%, capacitatea rezolutivă a electroforezei pe hîrtie a permis — după cum s-a arătat — sistematizarea cunoscută în clasificarea menţionată.

5.4.2.3. *Precipitarea fracţionată.* Fracţionarea alcoolică se face la temperaturi scăzute, prin metoda Cohn şi col. Cu ajutorul acestei metode se poate separa fracţiunea a III-a, care conţine lipoproteinele şi fracţiunea IV, în care se găsesc α-lipoproteinele.

5.4.2.4. *Testele de triaj*: precipitarea pre-β- şi β-lipoproteinelor prin heparină sau sulfat de dextran în prezenţa $CaCl_2$ sau $MnCl_2$ (Burstein-Samailles); sau prin polivinilpirolidonă (PVP) şi a pre-β-lipoproteinelor prin PVP în prezenţă de NaCl. Se practică şi o serie de alte variante. O probă

Scanned with OKEN Scanner

practicată pentru triaj este şi testul Kunkel-fenol, prin care se precipită β-lipoproteinele.

— *Cromatografia în faza gazoasă* s-a aplicat în special în studiul acizilor graşi din lipoproteine.

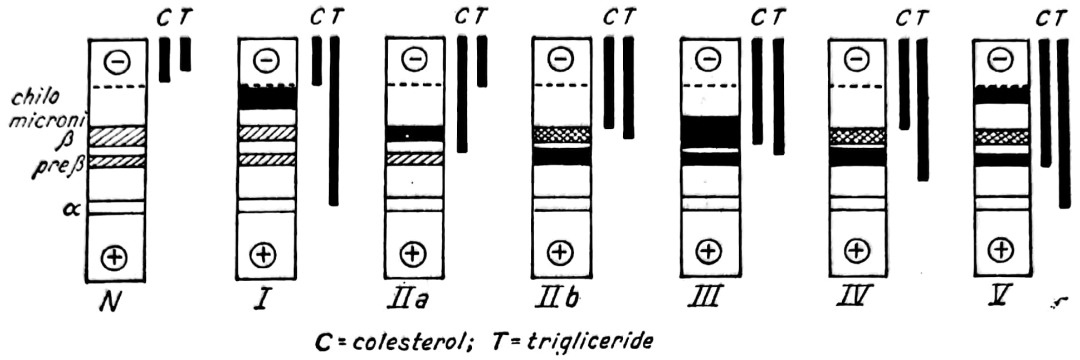


Fig. XIV.28. Tipurile de hiperlipoproteinemie (după Fredrickson).

— *Lipidograma* în gel de agaroză — practicată azi pe scară largă — permite detectarea şi caracterizarea corectă a diferitelor tipuri de hiperlipoproteinemie, redate în fig. XIV.28 şi prezentate mai înainte în capitolul X.

5.5. ENZIMELE PLASMATICE

Din cele circa 2 000 enzime cunoscute pînă în prezent, o mică parte se găsesc în plasmă (sau ser) şi sînt investigate în scop clinic de diagnostic, prognostic, stabilirea evolutivităţii proceselor cronice şi orientarea terapiei. Din cele şase clase de enzime desemnate prin denumiri sistematice în funcţie de reacţia catalizată — şi numerele de cod fixate de comisia de enzime IUB, patru clase sînt bine reprezentate printre enzimele plasmatice, utile patologiei biochimice: oridoreductazele, transferazele, hidrolazele, liazele. Enzimele din clasele V (izomerazele) — cu excepţia triofosfatizomerazei — şi VI (ligaze sau sintetaze) sînt mai puţin interesante pentru practica medicală curentă, deşi ele îşi păstrează toată importanţa pentru investigaţiile de patogenie la nivel molecular. Enzimele plasmatice sînt de provenienţă celulară, fiind difuzate din ţesuturi în sînge. După cum s-a arătat (capitolul IV) majoritatea enzimelor există în forme moleculare multiple (izoenzime sau izozime), genetic determinate sau epigenetic apărute. Se reaminteşte, pe scurt, că printre cauzele acestei heterogenităţi enzimatice se recunosc — pe lîngă determinismul genetic şi hibridizarea a două sau mai multe lanţuri peptidice prin legături necovalente (tip LDH) — şi următoarele posibilităţi: dubla localizare, în citosol şi mitocondrială (ex. GOT); conjugarea proteinelor cu alte grupări chimice (ex. fosforilaza a — fosforilaza b); scindarea unui lanţ peptidic (ex. tripsina din tripsinogen); polimerizarea unei unităţi de bază (ex. GLDH tetramer cu greutate moleculară 1 milion din patru unităţi de bază cu greutate moleculară 250 000); modificări conformaţionale (probabil prin diferite acţiuni alosterice).

Procedeele tehnice aplicate cel mai frecvent prin detectarea şi caracterizarea izoenzimelor în chimia clinică sînt cele electroforetice, cele bazate pe proprietăţi cinetice diferenţiale (inhibiţie termică sau chimică, afinităţi diferite K_m diferit — faţă de substraturi, coenzime, analogi de substraturi sau de

Scanned with OKEN Scanner

coenzime). Mai puţin folosite sînt procedeele cromatografice pe coloane de schimbători de ioni sau filtrarea în gel de Sephadex sau — cu aplicare în chimia clinică curentă — aşa numitele „batch-procedure". În enzimologia curentă dozarea enzimelor se face prin evaluarea activităţilor iar caracterizarea compoziţiei izoenzimatice prin tehnica zimogramei — asocierea electroforezei de zonă în diferite geluri — agar, agaroză, acrilamidă, celogel (acetat de celuloză) — cu vizualizarea activităţii enzimatice prin procedee histoenzimatice. Complementar, se aplică una din modalităţile menţionate mai sus: în special, inhibiţia termică sau utilizarea inhibitorilor specifici (L-fenil alanina, pentru fosfataza alcalină intestinală de IPFP*) pentru esteraze, uree 2 M pentru LDH_5).

5.5.1. CLASIFICAREA FUNCŢIONALĂ A ENZIMELOR PLASMATICE

Enzimele prezente în plasmă aparţin, din punct de vedere al provenienţei şi funcţiei lor, următoarelor categorii:

a) *enzime secretorii cu rol activ în plasmă*, denumite şi enzime plasmatice funcţionale, sînt produse în special în ficat: enzimele coagulării, lecitin-colesterol-acil-transferaza (LCAT), pseudocolinesteraza, ceruloplasmina, renina. Nivelul lor plasmatic scade prin lezarea celulelor producătoare;

b) *enzime excreto-secretorii*, provenind din glandele exocrine şi pancreas, sînt excretate şi acţionează la nivelul tubului digestiv (amilaza, lipaza, tripsina, pepsinogenul). Activităţile lor cresc în plasmă prin lezarea celulelor de origine sau prin prezenţa unui obstacol la nivelul căilor excretorii precum şi prin creşterea permeabilităţii membranei celulelor secretorii.

c) *enzime celulare* cu loc de acţiune în celulele din care provin, sînt pasiv circulante şi cresc în plasmă prin lezarea celulei de origine. Au o valoare de indicatori plasmatici ai sediului de organ al leziunii ultrastructurale (V. XV). Enzimele cuprinse la punctele a şi b sînt, cu excepţia ceruloplasminei, hidrolaze. Enzimele de la punctul c cuprind reprezentanţi ai principalelor sisteme enzimatice energetice sau ale metabolismului plastico-funcţional. Ele pot fi clasate ca: oxidoreductaze (LDH, MDH, GLDH, Izocitrico-DH, sorbitol-DH), transferaze (GOT, GPT, CPK, OCT, gama GT), liaze (fructozo-1-6-difosfat-aldolaza şi fructoz-1-fosfat-aldolaza), hidrolaze (fosfataza alcalinică şi acidă, leucin-amino-peptidaza).

5.5.2. MECANISMUL DISENZIMIEI PLASMATICE

Mecanismul trecerii enzimelor şi izoenzimelor tisulare în ser este foarte complex. Ele ajung direct sau prin sistemul limfatic în spaţiul extracelular. Situaţiile patologice de la modificarea permeabilităţii selective a membranelor celulare, pînă la necroza de coagulare cu distrugerea celulei — determină revărsarea enzimelor în torentul circulator. Se poate admite că disenzimia plasmatică este o rezultantă a interacţiunii mai multor factori, dintre care principalii sînt următorii:

— viteza diferită a biosintezei enzimelor ce pot fi modificate la nivelul controlului genetic, în transcripţie sau translaţie;

* IPFP = izopropilfluorofosfat

Scanned with OKEN Scanner

— localizarea ultrastructurală diferită a enzimelor, cele citoplasmatice fiind mai uşor revărsate în circulaţie decît desmoenzimele legate de membranele organitelor;

— greutatea moleculară a enzimelor, cele cu greutate mai mare traversînd mai greu membranele;

— gradul de alterare al proceselor energetice şi consecutiv al permeabilităţii selective a membranelor;

— diferitele viteze de distribuţie a moleculelor enzimatice în spaţiul extracelular;

— timpul de înjumătăţire (T/2) diferit al enzimelor plasmatice care socotit în ore este: LDH_1 — 113 ore; GPT — 47 ore; GLDH — 78 ore; GOT — 17 ore; CPK — 15 ore; LDH — 5—10 ore;

— vascularizaţia organului lezat;

— inactivarea inegală la nivelul sistemului SRH;

— eliminare diferită, de altfel destul de redusă, prin bilă (fosfataza alcalină, 5'-nucleotidază, LAP, ceruloplasmină) şi urină (numai enzimele cu greutate moleculară mai mică de 60 000);

— schimbarea profilului enzimatic al organului prin boală;

— suprapunerea modelelor enzimatice caracteristice diferitelor organe lezate, de ex., în stare de şoc.

Majoritatea enzimelor ce pot fi puse în evidenţă în plasmă, sînt răspîndite în celulele tuturor organelor. Totuşi, există şi posibilitatea de localizare a leziunii celulare indicată prin modificări enzimatice ce permit concluzii diagnostice cu caracter de specificitate, prin următoarele modalităţi:

a) *dozarea unei enzime specifice de organ.* De altfel, sînt puţine enzime de acest fel (OCT, SDH, fructozo-l-fosfat aldolaza pentru ficat, CPK pentru muşchi);

b) *determinarea şi caracterizarea izoenzimelor* cu valoare organospecifică: LDH_1, LDH_2 pentru miocard, CPK/MB pentru miocard, LDH_5 pentru ficat;

c) *determinarea activităţii unor grupuri* (*baterii sau constelaţii de enzime*), cu stabilirea unor rapoarte caracteristice profilului de organ.

Dispersia profilului enzimatic de organ ca urmare a revărsării în plasmă. Lezarea principalelor organe ar trebui să se reflecte în plasmă sub aspectul profilului lor enzimatic caracteristic (Enzym-Verteilungsmuster). Reflectarea plasmatică a profilului de organ nu se observă totuşi în mod constant, deoarece se produce aşa numitul fenomen de dispersie a profilului, datorit complexităţii şi inegalităţii de contribuţie a factorilor cauzali menţionaţi mai înainte în determinismul fenomenului de disenzimie. Dispersia enzimatică este mult mai puţin marcată după o leziune unică şi gravă (infarct miocardic întins, necroză hepatică difuză), fapt care explică utilitatea testelor, în special în bolile acute. Agresiunile slabe şi repetate favorizează în aşa măsură fenomenul de dispersie, încît rapoartele activităţii enzimatice serice nu mai corespund celor din celulele de origine.

Metodele de investigare a enzimelor plasmatice se bazează pe: colorimetrie, spectrofotometrie în UV, în zona 340—366 nm (teste optice); fluorimetrie; procedee cromatografice în special sub forma „batch procedure"; imunodozări (cu antienzime) în variantele recent aplicate, şi chiar EISA şi ELISA (enzime linked immuno sorbent assay); procedee rapide sau simplificate pentru detectări orientative de valori enzimatice crescute.

Scanned with OKEN Scanner

5.5.3.1. *Oxido-reductaze.* Lactat dehidrogenaza (LDH), L-lactat: NAD^+-oxidoreductaza, EC 1.1.1.27.

Această enzimă este prezentă în toate celulele organismului catalizînd reacţia:

$$\begin{matrix}\text{piruvat}\\ +\\ NADH_2\end{matrix} \xleftarrow[\text{pH 10}]{\text{pH 7,2}} \begin{matrix}\text{lactat}\\ +\\ NAD\end{matrix}$$

La pH fiziologic echilibrul este în favoarea formării lactatului. După cum s-a precizat (capitolul IV), molecula de LDH este un tetramer alcătuit din două subunităţi peptidice H (tip miocardic) şi două subunităţi peptidice M (tip muscular scheletic) ce se asociază în cele cinci izoenzime cunoscute în toate ţesuturile.

Testiculul postpuberal conţine în plus o enzimă organospecifică — LDH_X — cu mobilitate electroforetică între LDH_3 şi LDH_4.

Modelele izoenzimatice LDH sînt de două tipuri: anodale, cu preponderenţă de subunităţi H şi izoenzime LDH1(H_4), LDH2(H_3M), aşa cum se întîlnesc în ser şi ţesuturile cu fosforilare oxidativă intensă (creier, rinichi, miocard) şi catodale, cu preponderenţă de subunităţi M şi izoenzime LDH4(HM_3) şi LDH5(M_4), ca în ţesuturile cu intensă glicoliză anaerobă (muşchiul scheletic).

Metode de dozare pentru LDH total: (1) test optic spectrofotometric, bazat pe reacţia piruvat + NaDH + H = lactat + NAD^+: absorbţia în UV scade prin transformarea NADH în NAD; (2) fluorimetrie, pe baza aceleiaşi reacţii, cu scăderea fluorescenţei prin trecerea NADH în NAD; (3) colorimetrie (reacţia Babson) pe baza reacţiei de culoare cu săruri de tetrazoliu care sînt reduse în formazan colorat. Cea mai utilizată sare este clorura de 2-(p-iodfenil)-3-(p-nitrofenil)-5-fenil-tetrazoliu. Reacţia foloseşte lactatul ca substrat şi este utilizată şi în chiturile comerciale de reactivi (Goedecke „Lac de histrat" şi chituri „Lachema LDH"); (4) teste rapide ce permit evaluări orientative a creşterii de LDH pe baza reacţiilor cu săruri de tetrazoliu sau diclorfenolindofenol.

Izoenzimele LDH se caracterizează prin: zimogramă, după electroforeză în gel de agar, în gel de amidon, folii de acetat de celuloză sau gel de poliacrilamidă, prin vizualizare pe baza reacţiei: lactat-NAD-fenazinmetosulfat-nitro BT; absorbţie selectivă pe DEAE celuloză sau DEAE Sephadex, LDH_1 şi LDH_2 fiind absorbite preferenţial; afinitate diferenţială faţă de substrat: omologul superior al acidului piruvic (2-oxobutiratul) este transformat preferenţial prin LDH_1, LDH_2 (— activitate α-hidroxibutiratdehidrogenazică (α-HBDH-test optic); inhibiţie diferenţială, prin concentraţie ridicată de substrat (lactat, ca în chitul „profil LDH" — Goedecke), pentru LDH_1 şi LDH_2 sau prin uree 2M pentru LDH_5: inhibiţie termică: 30 minute la 65%, se inhibă LDH_5, LDH_4. Distribuţia procentuală a activităţii LDH enzimogramă (evaluată prin densitomerie şi planimetrie) este următoarea în serul uman

Scanned with OKEN Scanner

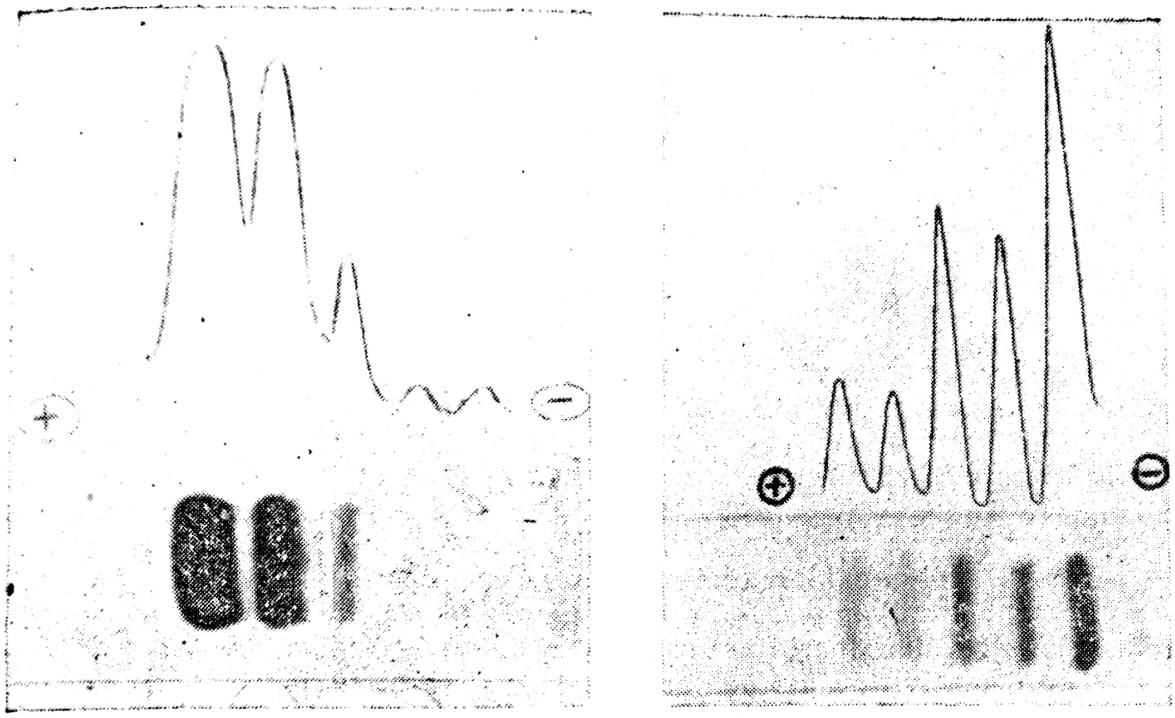


Fig. XIV.29. Zimograma serică LDH:
a) infarct miocardic; b) necroză hepatică.

normal: LDH_1: 30—37% LDH_2: 42—52; LDH_3 10—16%; LDH_4 3—4%; LDH_5 1,5—2%. Valori medii (I.M.I.*) LDH_1 40%, LDH_2 45,1%, LDH_3 11,2%, LDH_4 2,2%, LDH_5 1,5%.

Variaţii patologice, semnificaţii diagnostice. Creşterile de LDH total nespecifice se produc principal, în infarctul miocardic, necroza hepatică acută (hepatită virală acută), anemie pernicioasă, stări neoplazice, leucoze acute. Valoare diagnostică specifică au numai modificările izoenzimatice. Astfel, creşterile de LDH_1 şi LDH_2, cu LDH_1** mai mare ca LDH_2 în infarctulmiocardic, iar LDH_2 mai mare ca LDH_1 în anemia megaloblastică, anemia pernicioasă, stări hemolitice. LDH_5 este crescut în necroza hepatică şi uneori în procesele neoplazice (fig. XIV.29).

Izocitrat dehidrogenaza. L-izocitrat: NADP — oxidoreductaza decarboxilantă, E.C.: 1.1.1.42.

Enzima catalizează reacţia de oxidare a izocitratului în α-oxobutirat. În plasma umană se găseşte forma NADP dependentă. În interiorul celulelor enzima este distribuită bilocular: în mitocondrii şi citoplasmă. Activitatea izocitrico-DH totală a fost explorată în sindromul de citoliză hepatică (valori crescute). În pofida aşteptărilor, explorarea izoenzimelor ICDH nu a putut fi utilizată în scop diagnostic, decît într-o măsură restrînsă în bolile de ficat. În infarctul miocardic nivelul activităţii enzimatice serice nu înregistrează creşteri deoarece izoenzima miocardică este extrem de labilă.

* I.M.I. = Institutul de Medicină internă „N. Gh. Lupu".
** LDH este socotită identică cu αHBDH (α-hidroxibutivat dehidrogenaza) dozabilă prin test optic.

Glutamat dehidrogenaza (GLDH), L glutamat: NAD^+ — oxidoreductaza, EC: 1.4.1.2.

Enzima este prezentă în mitocondriile hepatice şi are o activitate mai redusă în miocard şi rinichi. Catalizează reacţia:

$$2 \text{ oxoglutarat} + NADH + NH_4 \longleftrightarrow \text{L-glutamat} + NAD^+ + H_2O.$$

GLDH serică are o deosebită semnificaţie prognostică, fiind indicator de leziune mitocondrială. Valorile raportului Schmidt, GOT + GTP/GLDH, aduc importante date în privinţa prognosticului unei hepatopatii evolutive.

Metodica de dozare: test optic pe baza reacţiei menţionate mai înainte. În mediu se adaugă ca activator ADP şi L-leucina. Valorile normale: bărbaţi 4 mUI/ml, femei 3 mUI/ml. Ca variaţii patologice sînt semnalate creşteri în ser în necrozele hepatice, colestază, infarct miocardic, abuz de alcool.

Sorbitoldehidrogenaza. L-iditol: NAD oxidaza, E.C. 1.1.1.14.

Această poli-ol-oxidoreductază, NAD dependentă, este specific hepatică În plasma normală nu se găseşte sau are concentraţie extrem de mică (0,2 mU/ml). Valori foarte crescute se întîlnesc în hepatita virală acută. În fazele de evolutivitate ale bolilor cronice, valorile sînt foarte uşor crescute. Se dozează spectrofotometric folosind fructoza ca substrat sau colorimetric prin reacţia de culoare cu rezorcină şi tiouree.

5.5.3.2. *Transferaze.* Glutamatoxalacetat-transaminaza (GOT) L-aspartat; 2-oxoglutarat-aminotransferază, E.C. 2.6.1.1.

Aceasta este o enzimă biloculară, citoplasmatică şi mitocondrială, prezentă în toate celulele, în special în miocard, ficat, muşchi şi rinichi.

Metodica de dozare: clorimetrie, bazată pe reacţia oxalacetatului produs în cursul transaminării, cu sarea de diazoniu (azoen Fast violet B=6 benzamido-4-metoxi-m-toluidin diazoniu clorid)sau FAST Ponceau L (N butil-4-metoxi-m-amil-amid-diazoniusalz); hidrazonele formate în mediul alcalin, din oxalacetat şi 2—4 dinitrofenilhidrazină; test optic cuplat cu reacţia auxiliară şi reacţie indicatoare NADH dependentă, cu MDH (malatdehidrogenază); variaţii mari pot fi sesizate prin test rapid cu vizualizarea activităţii GOT prin azoen Fast violet B. Valori normale 19—29 mUI/ml. Ca variaţii patologice sînt cunoscute creşteri în infarctul miocardic cu maximum în primele 24—48 ore cu normalizare în 4 pînă la 7 zile, precum şi în hepatopatii şi stări hemolitice.

Alanintransferaza (GPT). Glutamat-piruvat transaminaza, L-alanin: 2 oxoglutarat-aminotransferaza EC 2.6.1.2.

Enzima serică şi variaţiile ei au deosebită importanţă în patologia hepatică, deoarece citoplasma hepatocitelor o conţine în cantitate mare. Ca variaţii patologice creşterile de GPT sînt utilizate în diagnosticul precoce al formelor anicterice de hepatită şi în depistarea perioadelor de evolutivitate a hepatitelor cronice.

Metodica de dozare: (1) colorimetrie, prin dozarea piruvatului în cursul reacţiei, cu 2—4 dinitrofenilhidrazina şi formarea hidrazonei respective în mediul alcalin; (2) spectrofotometric prin test optic cuplat cu reacţia auxiliară

Scanned with OKEN Scanner

NADH-dependentă şi LDH ca reactiv enzimatic. Valori normale: bărbaţi 13—34 mUI/ml, femei 10—24 mUI/ml, valori patologice mai mari de 49 mUI/ml.

Creatin-fosfokinaza - CPK. ATP: creatin-N-fosfotransferaza, EC 2.7.3.2.

Enzima se găseşte în trei forme izoenzimatice, prezente în citoplasma şi mitocondriile din miocard, muşchi şi creier. Această enzimă ce catalizează formarea de ATP din creatin fosfat şi ADP este prezentă în ţesuturile menţionate sub următoarele forme: MM, în musculatura scheletică şi miocard, BB, în creier şi musculatura scheletică iar MB, în miocard. Creşterile patologice ale enzimelor serice (de la 10—20 de ori valoarea normală) şi variaţiile izoenzimelor sale, sînt deosebit de importante pentru patologie. Enzima serică se inactivează foarte repede prin oxidarea grupărilor SH şi ale situsului său catalitic. Ca variaţii patologice importante se cunosc creşterile mari (200—1 000 mUI/ml) în primele 2—3 ore cu maximum în 12—36 de ore în infarctul miocardic (proporţional cu întinderea necrozei). Paralel, se produc creşteri ale izoenzimei CPK/MB. În miopatii sînt semnalate de asemenea creşteri de CPK fără mărirea activităţii izoenzimei CPK/MB. Sînt observate în distrofia musculară, traumatisme musculare sau numai în caz de injecţii intramusculare, în polimiozită, dermatomiozită, hipertermia malignă post operatorie sau după biopsii musculare. În leziunile sistemului nervos central prin hemoragii cerebrale, în intoxicaţii cu somnifere, în electroşoc sau după narcoză (halotan) se produc creşteri de CPK fără modificarea izoenzimei CPK/MB. Metodica de dozare: prin test optic, spectrofotometric în două variante, metoda cu hexokinază şi glucozo-6-fosfatdehidrogenaza ca reactiv enzimatic şi metoda cu fosfoenolpiruvat (PEP), enolază, piruvatkinază. Colorimetric, bazată pe reacţie de culoare (albastru de molibden) a acidului fosforic liberat în reacţie. Valori enzimatice normale: varianta GL6 PDH, pînă la 50 mUI/ml iar varianta PK pînă la 1 mUI/ml; varianta colorimetrică 1—6 mUI/ml.

Ornitin carbamiltransferaza (OCT). Carbamoilfosfat: L-ornitincarbamoiltransferaza, C.E. 2.1.3.3.

Este enzimă specific hepatică, activă în ciclul ureogenetic. Catalizează transferul grupului carbamil de la carbamilfosfat la oritină, pentru formarea citrulinei (reacţia fiind favorizată de arseniat). Este un indicator sensibil de leziune hepatică. În hepatita virală acută creşterile merg pînă la x 100 ori valoarea normală. În ciroze şi metastaze hepatice, creşterile sînt moderate. Principala metodă de dozare, aplică microdifuzia amoniacului provenit din carbamilfosfat, urmată de reacţia de culoare a amoniacului cu reactiv Berthelot (hipoclorit de Na şi fenol). Se pot folosi procedee izotopice, în care gruparea carbamil a citrulinei este marcată cu ^{14}C.

γ-glutamiltranspeptidaza (transferaza) (γGT)γ-glutamilpeptid: aminoacidtransferaza, E.C. 2.3.2.2.

Enzima serică provine din membranele şi citoplasma celulelor care o conţin (epiteliile căilor biliare, prostata, celulele tubulare renale, căile excretorii pancreatice). Timpul său de înjumătăţire este de 72 de ore. Narcoticele, carcinogenele, hormonii sexuali şi alcoolul induc sinteza de γGT. Ca variaţii patologice importante cu valoare diagnostică diferenţială sînt creşterile acti-

vităţii enzimatice produse în colostaza intra- şi extrahepatică, abuzul de alcool, ciroza biliară, infarctul miocardic şi carcinomul prostatic.

Metoda de dozare: colorimetric, bazată pe scindarea γ-glutamil-4 nitroanilidei (sau mai avantajoasă a L-γ-glutamil-3 carboxi-4-nitroanilidei), cu măsurarea extincţiei 4-nitroanilidei liberate (în soluţie alcalină). Valori normale:

bărbaţi: 6—24 mUI/ml, femei: 5—11 mUI/ml.

5.5.3.3. *Hidrolaze. Fosfataza alcalină,* ortofosfomonoesterfosfohidrolaza, E.C. 3.1.3.1.

Fosfataza alcalină serică este alcătuită principal din trei forme izoenzimatice (hepatobiliară, osoasă şi intestinală), la care se adaugă în cursul sarcinii o formă tranzitorie, forma placentară. Creşterile fosfatazei alcaline serice sînt folosite în diagnosticul diferenţial al afecţiunilor hepato-biliare. False creşteri pot fi provocate de psihedelice, inhibitori ai ovulaţiei şi anticoagulante. Prednisonul şi testosteronul provoacă scăderi. Investigarea izoenzimelor fosfatazei alcaline permite localizarea leziunii care determină creşterea. Astfel, fosfataza alcalină osoasă are valori ridicate în cursul creşterii, în rahitism, boala Paget, hiperparatiroidism, metastaze osteoblastice (prostată, carcinom mamar), osteosarcoame. Forma intestinală, ajunsă pe cale limfatică în ser, creşte în cirozele hepatice, ulcerul duodenal (cercetări recente) şi prin excesul de grăsimi alimentare. Forme atipice se întîlnesc în procesele neoplazice, în special, hepatice. Fosfataza alcalină de tip Regan ca şi Nagao este corespunzătoare biologic şi biochimic celei placentare fiind adesea prezentă în serul purtătorilor de tumori maligne (hepatoame). Este termostabilă.

Metodica de dozare şi caracterizare izoenzimatică: colorimetric prin metoda internaţional standardizată în prezent, bazată pe hidroliza paranitrofenilfosfatului.

Izoenzimele se pun în evidenţă şi se caracterizează prin: electroforeză în gel de amidon sau de poliacrilamidă, vizualizarea făcîndu-se prin azocuplare cu sarea de diazoniu Fast blue BB, cu naftolul provenit din α-naftil fosfat (substrat). Mobilitatea electroforetică este diferită cu forma moleculară a fosfatazei alcaline, ordinea descrescîndă a acestei valori fiind de la anod către catod, următoarea: hepatică, osoasă, intestinală.

Stabilitatea termică a fosfatazelor alcaline hepatică şi mai ales placentară se pune în evidenţă prin încălzirea serului 10 de minute la 56°. Forma intestinală a fosfatazei alcaline poate fi pusă în evidenţă prin inhibiţie chimică diferenţială cu L-fenilalanină, L-tirozină, L-triptofan. Fosfataza alcalină placentară este de asemenea inhibată prin L-fenilalanină. Valori normale ale fosfatazei alcaline: adulţi 14—48 mUI/ml, copii 40—140 mUI/ml.

Fosfataza acidă, ortofosfomonoester-fosfohidrolaza, E.C. 3.1.3.2.

Enzima se găseşte în toate organele, dar mai cu seamă în unele ce pot fi înşiruite astfel, în ordinea descrescîndă a conţinutului lor în enzimă: prostata, oasele, ficatul, splina, rinichiul, eritrocitele, leucocitele, trombocitele şi glandele endocrine. Fosfataza acidă este heterogenă. În omogenatele de prostată au fost detectate prin electroforeză în gel de poliacrilamidă trei fracţiuni. Enzima este instabilă, inactivîndu-se la temperatura de peste 37°, aşa încît dozările respective nu sînt recomandabile în stările febrile. Ca variaţii pato-

Scanned with OKEN Scanner

logice sînt foarte importante pentru diagnostic pozitiv şi diferenţial, creşterea activităţii fosfatazei acide şi mai ales a izoenzimei sale tartrico-sensibilă, în carcinomul de prostată metastazat. Trebuie menţionat că se produc creşteri uşoare prin manipulări pe prostată (palpare) sau după citoscopie şi cateterism. Creşteri ale fosfatazei acide de origine osoasă se produc prin metastaze osoase ale cancerelor, mai ales de colon, mamar, din corticala suprarenală şi pulmonar. Fosfataza acidă trombocitară este liberată în ser în cursul coagulării. Creşteri remarcabile se produc prin distrugerea trombocitelor în tromboze, embolii pulmonare, trombastenii.

Metodica de dozare: colorimetric, pe baza aceleiaşi reacţii de hidroliză a paranitrofenilfosfatului dar în mediu acid. Izoenzimele se caracterizează prin mobilitate electroforetică sau inhibiţie chimică diferenţială: L-tartratul inhibă activitatea izoenzimei prostatice (şi a celei leucocitare) iar aldehida formică inhibă izoenzimele de sursă eritrocitară şi trombocitară. Valori normale pentru activitatea totală pînă la 11 mUI/ml; pentru izoenzima tartrico-sensibilă: 0,57—1,5 mUI/ml.

5-Nucleotidaza. 5-ribonucleotid-fosfohidrolaza, C.E. 3.1.3.5.

Enzima acţionează numai asupra nucleotizilor fosforilaţi la carbonul 5 din riboză. Creşterile acestei activităţi enzimatice sînt utile în diagnosticul icterelor obstructive. Testul este tot atît de util ca şi creşterea fosfatazei alcaline, dar mai selectiv pentru diagnosticul diferenţial. Activitatea 5′-nucleotidazică nu creşte prin leziuni osoase cu interesare osteoblastică, aşa cum se întîmplă cu fosfataza alcalină. Dozarea se face colorimetric, bazată fiind pe formarea albastrului de molibden din acidul fosforic liberat de enzimă.

α-Amilaza 1,4-α-D-glucan-glucanohidrolaza, E.C.3.2.1.1.

Enzima este eterogenă şi prezentă în ser cu două forme izoenzimatice principale: salivară şi pancreatică. O formă moleculară rară este întîlnită ca macroamilazemie serică, izoenzimă care — datorită dimensiunii sale mari — nu trece prin rinichi. Amilaza hidrolizează amidonul, glicogenul, poli- şi oligo-zaharidele, cu liberarea produselor de degradare, în configuraţie α. Se găseşte în salivă, pancreas, suc duodenal, ficat, intestin subţire (după unii autori chiar şi în creier). Ca variaţii patologice cu importanţă diagnostică se cunosc creşterile importante din pancreatita acută (cu lăţirea benzii pancreatice în zimogramă), în parotidite şi sialolitiază (cu lăţirea benzii salivare în zimogramă). Se observă creşteri nespecifice în peritonite, ileus, perforaţii, sarcină extrauterină perforată. Valorile crescute în ser se însoţesc şi de creşteri urinare, clearance-ul enzimei fiind foarte ridicat, cu excepţia macroamilazemiei în cursul căreia amilaza urinară lipseşte.

Metodica de dozare. Evaluarea se face pe bază colorimetrică cu două variante principale: 1) măsurarea degradării amidonului, prin reacţia de culoare albastră iod-amidon. Evaluarea se face pe baza scăderii extincţiei. 2) Degradarea polimerilor de amidon insolubili în apă, legaţi cu un colorant (ex. remazolbrilliant-blau-B). Evaluarea se face pe baza creşterii extincţiei datorită colorantului liberat.

Valori normale în prima variantă 70—300 UI/l, în varianta a II-a 130—2 000 UI/l.

Scanned with OKEN Scanner

Caracterizarea izoenzimatică prin zimogramă se face în două variante, după electroforeza în gel de agar: a) cu vizualizare prin reacţia zaharogenică (cu glucozoxidază, maltază, peroxidază şi cu cromogen tip ortotoluidină) şi b) prin reacţia iod-amidon.

Lipaza pancreatică (triglicerol-acil-hidrolaza) — E.C. 3.1.1.3.

Această enzimă este mai puţin explorată în mod curent. Creşte în afecţiuni pancreatice acute. Se dozează cu trioleină sau ulei de măsline prin titrarea acizilor graşi eliberaţi sau forometria săpunurilor de cupru provenite din acizii graşi liberaţi de enzime.

Colinesterazele. Acetilcolin-hidroliza, E.C. 3.1.1.7 şi *colinesteraza nespecifică* (pseudocolinesteraza): E.C. 3.1.1.8.

În timp ce prima enzimă din această categorie hidrolizează strict acetilcolina, cea de a doua hidrolizează benzoil-colina tributiril-colina, acetiltiocolina. Enzimele sînt heterogene. Se cunosc variante antipice ale pseudocolinesterazei ce justifică comportarea anormală (apnee prelungită) faţă de relaxantele musculare ca suxametoniul (succinilcolină), utilizate în anestezia generală. Inhibiţia diferenţială prin dibucaină şi NaF servesc la stabilirea variantelor genetice ale pseudo-colinesterazei la om.

Ca variaţii importante patologice se cunosc scăderile pseudocolinesterazei în afecţiuni hepatice cronice evolutive; în special în ciroză. Importante scăderi se produc de asemenea în intoxicaţiile cu organo fosforice. Ca *metodică de dozare* se aplică: titrimetria, folosind acetil colina ca substrat, colorimetria cu folosirea acetil tiocolinei ca substrat şi evaluarea tiocolinei liberate cu acid bis 5-5'-ditio-nitro-benzoic (DTNB); dozarea orientativă prin test rapid bazat pe viraj de culoare produs de acidul acetic liberat de enzimă. Izoenzimele sînt caracterizate prin electroforeză în gel de agar cu vizualizare bazată pe azocuplare. Pot fi caracterizate şi prin inhibiţie chimică diferenţială cu NaF di-izopropilfluorofosfat etc. Valori normale 1 900—3 800 mU/ml.

Leucinaminopeptidaza (LAP) L-leucil-peptidilhidrolaza, E.C. 3.4.11.1.

Această enzimă este plasmatică şi provine preponderent din celulele parenchinului hepatic, fiind prezentă însă şi în alte organe ca: pancreasul, rinichiul, intestinul, mucoasa. Este heterogenă; în plasma normală activitatea LAP în zimogramă, se concentrează în zona de mobilitate electroforetică α_1; iar în condiţii patologice în zone de mobilitate electroforetică α_2. Enzima catalizează liberarea hidrolitică a leucinei N-terminale din peptidele leucinice şi analogii de peptide. Valori normale: 2—6 UI/l. Variaţiile patologice importante pentru diagnostic diferenţial şi pozitiv, sînt creşterile semnalate în icterele obstructive prin obstacol biliar (litiază biliară sau neoplasm de cap de pancreas, precum şi în colostaza hepatică).

Renina E.C. 3.4.99.19.

Enzima este o protează implicată în sistemul renină-angiotensină (cap. XIX). Se dozează în sîngele venos periferic, sau în sîngele venos renal, la regim normosalin sau după regim declorurat. Se dozează biologic prin măsurarea angiotensinei II (la şobolani), sau radio imunologic prin măsurarea angiotensinei I, provenită din angiotensinogen. Valori normale: pînă la 35—59 micro U Renin/ml. Valori crescute se întîlnesc în hipertensiunea renală, în hiperaldosteronism secundar, hiperplazia aparatului juxtaglome-

Scanned with OKEN Scanner

rular, alcaloza hipokaliemică. Scăderi ale valorilor se observă în parkinsonism şi hiperaldosteronism primar.

5.5.3.4. *Liaze.* Se cunosc trei tipuri de aldolaze: A, din muşchi, B din ficat şi C din creier.

Dintre acestea se găsesc în ser formele A şi B. Sînt enzime tetramerice. Enzima hepatică: fructozo-1-fosfat-aldolaza = cetozo-1-fosfat-aldolaza, E.C. 4.1.2.13, se dozează prin test optic cuplat cu reacţia auxiliară şi reacţie indicatoare, cu măsurarea în final a activităţii gliceraldehid-3-fosfat-dehidrogenazei sau colorimetric prin metoda hidrazonelor.

Enzima musculară, fructozo-1-6-difosfat-aldolaza — fructozo-1-6-difosfat-D-gliceraldehid-3-fosfat-liaza, C.E. — 4.1.2.1.3.

Dozarea ei se face ca la enzima hepatică, prin test optic cuplat cu reacţia auxiliară şi reacţia indicatoare sau prin metoda hidrazonelor.

Valori normale: activitatea aldolazică totală: 0,5—4,4 UI/l (la 25°) şi 2—6 UI/l (la 37°). Tipul A reprezintă 57—88% din activitatea totală, iar B 12—47%. Ca variaţii patologice importante sînt de semnalat creşterile observate în hepatopatii şi miopatii, în infarctul miocardic şi în cancerul vezical.

Din ansamblul explorărilor enzimatice, sînt redate principalele investigaţii ale enzimelor serice, cu valoarea diagnostică în tabelul XIV.6.

6. CONSTITUENŢI ANORGANICI AI PLASMEI

Principalul constituent mineral al plasmei este apa. Ea îndeplineşte funcţia de solvent pentru toate celelalte componente, atît cele organice, cît şi cele minerale.

6.1. GAZELE DIN SÎNGE

Gazele din sînge, oxigenul şi bioxidul de carbon, sînt parţial dizolvate în plasmă în conformitate cu legea lui Henry, adică proporţional cu presiunea parţială a fiecăruia — la o temperatură constantă. În cea mai mare parte, ele sînt legate chimic de proteina transportoare — hemoglobina (V.3.1.11). Se reaminteşte că valoarea coeficientului de solubilitate al oxigenului în plasmă la 38° este de 0,023 cm^3/ml, cînd presiunea parţială a oxigenului este de 760 mm Hg (o atmosferă). Din 100 ml sînge se pot extrage 20 cm^3 de oxigen din care, prin calcul ţinîndu-se seama de presiunea parţială a gazului în aerul alveolelor (102 mm Hg) se deduce că numai 0,031 cm^3 O_2/ml este divolvat cea mai mare parte fiind legat ca oxihemoglobină. Solubilitatea bioxidului de carbon în plasmă la 38° este de circa 20 de ori mai mare decît aceea a oxigenului. Cantitatea totală de CO_2 ce se poate extrage din 100 ml sînge, oscilează între 40—60 cm^3 (după cum este vorba de sînge arterial sau venos) din care, circa 1/2 reprezintă gazul dizolvat fizic. Restul de CO_2 din sînge se găseşte sub formă de combinaţii multiple, atît cu hemoglobina în eritrocite, cît şi în plasmă cu ioni bicarbonici, HCO_3^-, urme de H_2CO_3 şi CO_2 combinat cu proteinele plasmatice (printr-o reacţie spontană reversibilă, cu grupările NH_2 din proteine).

Scanned with OKEN Scanner

Principalele investigaţii enzimatice serice cu valoare diagnostică

Organul lezat	Boala	Enzime, izoenzime Rapoarte enzimatice
Miocard	Infarct miocardic acut	CPK, izoenzima CPK, MB, 3-gliceraldehid-fosfatdehidrogenază, fosforilaza b, LDH total, izoenzima LDH_1, α-hidroxibutiratdehidrogenaza (α HBDH), GOT, izoenzima mitocondrială GOT, $\gamma\text{-GT}; \frac{CPK}{CPK \cdot MB}, \frac{CPK}{GOT}$
Ficat	Hepatopatii acute şi cronice	F-1-P-ALD, SDH, OCT, Arginaza, ICD, izoenzima LDH_5, GPT, GOT, guanaza, urocanaza, GLDH, pseudocolinesteraza, izoenzima mitocondrială GOT, xantinoxidaza, P—ALC: $\frac{GOT}{GPT}, \frac{GOT+GPT}{GLDH}$
	Icter obstructiv	Leucinaminopeptidaza (LAP), γ-GT, 5′-nucleotidaza, izoenzima P-ALC hepatobiliară.
	Stări hemolitice	LDH, izoenzima LDH_3, LDH_1, GOT, $\frac{LDH}{GOT}$.
	Cancer primitiv	F-1-, 6-difosfataldolaza, F-1-P-ALD, izoenzime fosfatază alcalină — Nagao, Regan în hepatoame, LDH, LDH_5 „fetalizarea" modelului izoenzimatic LDH (LDH_3 preponderent)
Prostată	Cancer Cancer cu metastaze osoase	Fosfatază acidă, izoenzima fosfatazei inhibată de acid tartric. Izoenzima osoasă a fosfatazei alcaline.
Pancreas	Pancreatită acută	Amilaza, izoenzima pancreatică a amilazei (cu mobilitate electroforetică γ), lipaza serică
Parotida	Parotida acută	Amilaza, izoenzima γ-amilaza rapidă.
Os	Metastaze osoase Osteomalacie Hipertiroidism Boala Paget	Fosfataza alcalină, izoenzima osoasă a fosfatazei alcaline
Muşchiul scheletic	Miopatii Distrofii musculare	F-1-, 6-difosfataldolaza, devierea modelului izo-LDH de la LDH_5 către LDH_1, CPK izoenzima CPKMM.

Scanned with OKEN Scanner

6.2. ELECTROLIŢI

Substanţele minerale dizolvate în plasmă sînt în stare ionică, cu realizarea unui echilibru între anioni şi cationi. Din acest motiv de echivalenţă între ionii cu sarcină pozitivă şi cei cu sarcină negativă, concentraţia acestor substanţe disociabile se exprimă în miliechivalenţi. Repartiţia componentelor minerale între plasmă şi eritrocite este diferită. Dacă se iau în consideraţie doi din anionii principali ai acestor compartimente — Cl şi HCO_3 — se poate face următoarea observaţie cu importanţă fiziologică. Pentru compensarea creşterii de ioni bicarbonici ce se produc în eritrocit, o parte din aceşti anioni sînt transferaţi în plasmă. Aceştia se combină cu ionii Na^+ proveniţi din NaCl plasmatic iar ionii Cl eliberaţi pătrund în eritrocit. Deci majoritatea ionilor bicarbonici formaţi sînt repartizaţi în plasmă. Această distribuţie este în parte şi un efect al echilibrului Donnan, eritroplasmatic. În eritrocit componenta anionică este bine reprezentată prin hemoglobină (30 mEq), acid difosfogliceric (35 mEq) şi ATP (2 mEq) care lipsesc în plasmă, unde proteinele plasmatice (15 mEq) reprezintă o mică parte a componentei anionice. Ca urmare, în plasmă se găseşte obligatoriu o cantitate mai mare de anioni uşor difuzabili decît în eritrocit; în primul rînd ionul HCO_3^-.

6.2.1. IONOGRAMA PLASMATICĂ NORMALĂ

Aceasta însumează 310 miliechivalenţi, fiecare categorie reprezentînd 155 mEq. În patologie se pot observa variaţii cantitative, globale, cu scăderea numărului de miliechivalenţi sub 310, precum şi variaţii de repartiţie a fiecărui ion în parte.

Metodica de stabilire a compoziţiei minerale a plasmei (ca şi a altor fluide biologice) se bazează principial, pe următoarele tehnici: măsurarea rezistivităţii (inversul conductivităţii electrice care depinde de concentraţia substanţelor ionizate din mediu), prin cromatografie pe răşini schimbătoare de ioni (cationiţi, anioniţi), urmată de titrare prin fotometrie de flacără. prin spectrofotometrie de absorbţie atomică; prin folosirea electrozilor selectivi;

6.2.2. PRESIUNEA OSMOTICĂ A PLASMEI SANGUINE

Se reaminteşte că presiunea osmotică reprezintă forţa de atracţie exercitată de o soluţie asupra apei pure cînd cele două lichide sînt separate printr-o membrană semipermeabilă. Presiunea osmotică a plasmei sanguine este proporţională cu numărul de ioni electrolitici şi cu cel de molecule de substanţe nedisociate (principal glucoză şi uree), dizolvate în plasmă. Electroliţii răspund cu 85% din valoarea presiunii osmotice a plasmei sanguine. Ea se exprimă în miliosmoli. Un miliosmol reprezintă presiunea osmotică a unei molecule-gram, dizolvată într-un litru de apă (22,4 atmosfere la 0°). Presiunea osmotică se măsoară, fie prin dozarea principalilor electroliţi şi convertirea valorilor de concentraţie în miliosmoli, fie prin crioscopie. Această ultimă modalitate se bazează pe relaţia de proporţionalitate directă (liniară) dintre coborîrea punctului de îngheţare a unei soluţii şi presiunea sa osmotică.

Coborîrea punctului de îngheţare a plasmei, notată cu delta (Δ) este egală cu $-0{,}56 \pm 0{,}01$. Convertirea acestei valori în miliosmoli se face prin relaţia: $\Delta \times 5{,}4$ Δ exprimat în 1/100 grad de exemplu $56 \times 5{,}4 = 302$ mOsm. Cunoscînd

Scanned with OKEN Scanner

numărul de miliOsm prin dozarea diferiţilor ioni, se poate calcula $\Delta = n \times$ $\times$ miliOsm $\times 0{,}00185$ (în care 0,00185 este coborîrea crioscopică produsă de 1 miliOsm).

6.2.3. CATIONII

6.2.3.1. *Sodiu* (Na^+) reprezintă 58—60 mEq/kg corp, totalizînd 4 000—4 200 mEq la un adult de 70 kg. El este cationul umorilor, atingînd în plasmă concentraţia medie de 142 mEq $\pm$ 2 DS/l sau 152 mEq/l de apă plasmatică. Sodiul plasmatic reprezintă 15% din sodiul uşor difuzabil al organismului (ce se determină prin metode radioizotopice). Concentraţia Na^+ fiind mai mare decît a celorlalţi cationi, el este şi principalul factor al reglării presiunii osmotice şi al echilibrului acido-bazic. Între concentraţia ionului de Na^+ (extracelular) şi aceea a ionului K^+ (intracelular) există un echilibru ce se realizează printr-un mecanism de transport activ la nivelul membranelor celulare, aşa numita „pompă de electroliţi". Perturbările concentraţiei ionului Na^+ depind în special de repartiţia apei din diferitele compartimente. Se cunosc stări de hiponatremie cît şi de hipernatremie. Fiziopatologic sînt stări de hiponatremie de diluţie şi de depleţie. Hipernatremiile se realizează prin lipsa de apă sau exces de Na, exces de eliminare a apei, fără eliminare de Na.

6.2.3.2. *Potasiu* (K^+) este cationul spaţiilor intracelulare reprezentînd 98% din K total al organismului (150 grame corespunzător la 3 500 mEq la adultul normal de 70 kg). În plasmă cantitatea de K este de 125—135 g, concentraţia sa fiind de numai 4,7 mEq $\pm$ 2 DS/l plasmă. Valorile extreme fiind 3,8—5,4 mEq/litru, mai bine de 90% din potasiul total al organismului este uşor difuzabil.

Ca *variaţii patologice* se cunosc hipokalemii şi hiperkalemii. Vor fi menţionate cîteva dintre aceste sindroame de dezechilibru potasic. Hipokalemia se traduce clinic, în special prin tulburări neuromusculare şi cardiace. Se asociază cu alcaloza metabolică. Hipokalemii se întîlnesc în sindroamele digestive chirurgicale (obstrucţie intestinală înaltă, stenoză pilorică), cu cloropenie, alcaloză, azotemie extrarenală sau în sindroamele toxice din gastroenteritele acute ale sugarului, de asemenea, în cursul tratamentelor cu sulfamide inhibitoare ale anhidrazei carbonice (acetazolamidă), diuretice mercuriale sau din seria clorotiazidelor precum şi în aplicarea dializei peritoneale sau în rinichiul artificial. În hiperaldosteronism se produce alcaloza hipokalemică, ca şi în sindromul Cushing, hipokalemia hipocloremică. Se cunosc şi hipokalemii de cauză metabolică în coma diabetică, coma hipoglicemică şi paralizia periodică familială. Hiperkalemia, mai rară dar mai gravă decît hipokalemia, se instalează insidios şi poate ajunge la accidente grave, adesea ireversibile, cu paralizie fără abolirea reflexelor şi oprirea inimii în diastolă. Se poate produce prin insuficienţă corticosuprarenală, insuficienţe renale grave post traumatice, în sindroamele hemolitice sau prin tulburarea ereditară numită adinamie episodică ereditară (Garnstop).

6.2.3.3. *Calciul.* Conţinutul plasmatic în calciu este de 4,5—5,5 mEq sau 2,3—2,75 m moli (90—110 mg/l). Conţinutul total de Ca al unui adult de 70 kg este de 1 100—1 500 g. Concentraţia plasmatică a Ca este remarcabil de fixă. Cationul este reprezentat în trei fracţiuni: a) fracţiunea ultrafiltrabilă

Scanned with OKEN Scanner

ionizată reprezentînd 60% din total, fiind forma activă implicată în osificare, coagulare, excitabilitate neuromusculară; b) fracţiunea ultrafiltrabilă neionizată reprezentînd 4% din total în care ionul este fixat în combinaţii saline sau complexe nedisociabile; c) fracţie neutră filtrabilă 36% din calciul total sub formă de proteinat de calciu, în special, în albumină serică. Determinările se fac prin metodele indicate la determinarea — în general — a ionilor, la calciu rămînînd să fie menţionată şi posibilitatea de dozare chimică complexometrică. Aplicarea spectrofotometriei de absorbţie atomică pentru dozările de calciu cere adăugarea de triclorură de lantan.

Variaţii patologice se cunosc sub formă de hipocalcemii şi hipercalcemii. În patologia umană a adultului şi mai ales a copilului, hipocalcemia este legată de sindromul de tetanie. Se întîlnesc hipocalcemii în insuficienţa paratiroidiană, lipsa de vitamina D, sau în rahitismul rezistent la vitamina D, cînd are loc scăderea sintezei de 1,25 dihidroxizicolecalciferol; în osteodistrofia renală sau în creşterile detireocalcitonina. Hipercalcemii se întîlnesc în distrugerile osoase, mielomul multiplu, osteoliza malignă, hiperparatiroidism, boala băutorilor de lapte, sarcoidoza, osteoporoza de mobilizare.

6.2.3.4. *Magneziul* ajunge în plasmă la o concentraţie de 1,5—1,83 mEq/l sau 0,7—1,2 m moli/l. Conţinutul total al organismului uman adult este de 823—1 235 mmoli magneziu. Magneziul plasmatic este 70% ultrafiltrabil, restul fiind legat de albumine α_1 şi α_2-globuline. Variaţii patologice se cunosc prin scăderi determinate prin tulburări de resorbţie, pancreatită, ciroze, alcoolism, hiperaldosteronism. Concentraţia plasmatică a magneziului creşte în coma diabetică, uremie, sindromul Cushing. Metodica de dozare a magneziului are la bază colorimetria, cu folosirea unei reacţii dintre magneziu şi anumite substanţe organice precum şi spectrofotometria de absorbţie atomică.

6.2.4. ANIONII

6.2.4.1. *Clorul* este cel mai important anion al compartimentului extracelular, concentraţia sa plasmatică normală fiind — în medie — 104 mEq ± DS/l. Între clorul globular şi cel plasmatic există un raport constant = 0,52 (mult explorat în trecut). Concentraţia clorului urmează pasiv modificările de concentraţie ale ionilor de Na^+. Se cunosc hipocloremii prin alcaloză metabolică, hipercloremii prin acidoză metabolică. Este interesant deci de urmărit suma concentraţiilor ionilor de clor şi ionilor dicarbonici. Metodica de dozare este în special titrimetrică cu folosirea sărurilor de mercur. Metoda clasică bazată pe folosirea nitratului de argint, este pe cale de a fi părăsită.

6.2.4.2. *Fosforul**. Fosforul din plasmă este alcătuit din componente minerale şi organice. Componentele minerale sînt reprezentate de ortofosfaţii mono- şi dimetalici. La pH 7,4, 80% din fosfaţii anorganici se găsesc ca HPO_4^{2-} iar restul ca H_2PO_4. Pe lîngă fosfaţii ionizaţi se găseşte şi o cantitate mică de fosfat tricalcic nedisociabil. Concentraţia fosforului plasmatic este de 2 mEq corespunzător la 0,8—1,48 mmoli sau 25—40 mg P/l. La copil sugar şi adolescent, valorile sînt mai ridicate (40—65 mg P/l sau 1,3—2,1 milimoli P/l, respectiv 40—52 mg P/l sau 1,3—1,7 mmoli). Important pentru mecanismele

* În practică se folosesc doi termeni: fosforemia şi fosfatemia ce corespund celor două moduri de exprimare a rezultatelor în P (element) sau în fosfaţi (sarea). De obicei, prin termenul fosforemie se exprimă compuşii fosfatici.

Scanned with OKEN Scanner

de reglare ale echilibrului fosfo-calcic este faptul că o creştere a fosfatemiei are drept consecinţă imediată o scădere a calcemiei. Fosforul plasmatic se dozează colorimetric pe baza reacţiei de formare a albastrului de molibden sau prin formarea complexului fosfo-molibdo-vanadic. Se utilizează în ultimul timp şi formarea de complecşi cu coloranţi (verde malachit, briliant, grün). Se produc hiperfosfatemii în insuficienţele renale, hipoparatiroidism, supradozare de vitamina D, osteoporoză, osteogeneză imperfectă, acromegalie hipertireoză. Hipofosfatemii apar prin tulburări de resorbţie şi rahitism primar.

6.2.4.3. *Sulful* se găseşte în plasmă sub mai multe forme, care însumate alcătuiesc sulful total, corespunzător unei concentraţii de 1,40 g/l. Partea majoră a acestuia este reprezentată de acizii aminaţi, tioloforiu, din proteinele sanguine. Sulful neproteic care are concentraţia cuprinsă între 0,07—0,10/l de plasmă (sau sînge total) cuprinde două fracţiuni: sulf neutru (acizi aminaţi sulfuraţi şi derivaţi cu grupare tiol) şi sulf oxidat (sulfatul, esterii sulfurici). Nivelul sulfului din sulfaţi este cuprins între 0,01—0,03 g/l. În ionogramă sulfaţii reprezintă un mEq. Se cunosc variaţii ale sulfului în sensul creşterii.

6.2.5. OLIGOELEMENTE

6.2.5.1. *Fierul.* Sideremia normală are valoare medie 120 μg cu valori extreme 70—170 μg %. Nivelul de concentraţie are variaţiile sale circadiene — prin scăderi vesperale cu circa 30 μg %. Variaţiile patologice au fost prezentate la 5.3.2.3. Se dozează prin reacţia cu batho-fenantrolină-sulfonată.

Sideremia acoperă o treime din capacitatea de legare în transferină reprezentînd numai o mică parte din fierul total al organismului (3—5 g). Se reaminteşte aici un test important pentru practica medicală, anume cel legat de tratamentul cu desferi-oxamină (desferal).

După injecţia intramusculară a 500 mg de desferi-oxamină, se formează un chelat cu Fe, care se elimină în urină. La normal se elimină 13,41 μmol Fe (0,75 mg)/6 ore. În hemocromatoză primară se elimină peste 89,4 μmol (5 mg) Fe, iar în hemosiderozele simptomatice, în jur de 35,8 μmoli (2 mg) Fe/6 ore. În anemiile aplastice şi sideroacrestice se remarcă supraîncărcarea eritroblaştilor, a celulelor reticulocitare şi a organelor cu Fe; de asemenea, se observă resorbţie crescută în hemocromatoze — cea primară, genetic determinată — sau cele secundare.

În patogenia variaţiilor sideremiei pot fi menţionate următoarele cauze: hiposideremii uterine (meno- şi metrorargii), hemoragii din testicul, gastrointestinale (inclusiv hemoroizii), tulburări de resorbţie a Fe, pierderi de transferină (renale sau enterale), tulburări de distribuţie a Fe în intestin sau neoplazie, încetinirea mobilizării Fe din depozite către transferină, supraîncărcarea cu Fe a SRH. Hipersideremii se observă în citoliza hepatică cu pierderi de feritină, în tulburări de utilizare a Fe în sinteze ca în anemiile aplastice şi sideroacrestice, supraîncărcarea eritroblaştilor, celulelor, reticulocitelor şi a organelor cu Fe.

6.2.5.2. *Cuprul* aflat în ser reprezintă o mică parte din totalul de 100—150 mg de care dispune organismul. Concentraţia sa este de 11,66—23,61 m moli/l, adică 850—1 500 μg/l la bărbaţi, iar la femei 700—1 400 μg/l. Principalul deţinător de cupru plasmatic este ceruloplasmina (vezi 5.3.2.2.) Cuprul plasmatic este în echilibru cu cel inclus în enzime (peroxidază, tiro-

Scanned with OKEN Scanner

zinază, δ-amino-levulinic-dehidrogenază). Metodica de dozare este bazată pe spectrofotometrie de absorbţie atomică, colorimetrie şi folosirea de electrozi selectivi.

În colorimetrie se utilizează reacţia ionului cupros cu batocupreină (sarea disodică a acidului 2, 9-difenil-1, 10-fenantrolină disulfonică). În urma reacţiei se dezvoltă culoarea roşie-gălbuie. Alţi reactivi pentru cupru monovalent sînt: cuprinzona, 1, 5-difenil-carbodihidrazida, dietilditiocarbamatul Na. Dintre variaţiile patologice ale cuprului, cele mai importante sînt cele din boala Wilson. Se mai cunoaşte şi aşa numita boală ereditară a părului încreţit cu transmisie recesivă legată de cromozomul X.

6.2.5.3. *Zincul* din ser se află în concentraţie de 122—214 u mol/1 (0,80—1,40 mg/l), reprezentînd o mică parte din conţinutul total de 2—3 g al organismului. Concentraţia serică a Zn este de 10 ori mai mică decît cea eritrocitară care, la rîndul ei, este depăşită cu mult de cea leucocitară. Zn plasmatic este structural legat de α_2-macroglobuline ca şi de unele enzime plasmatice (fosfataza alcalină, GLDH, carbonicanhidraza, uricaza) şi formează complexe cu hormonii proteici (insulină, ACTH). Ca metode de dozare se cunosc variante, bazate pe analiza de activare neutronică, spectrofotometria de absorbţie atomică, metode chimice cu rezultate nereproductive. Variaţiile patologice sînt mai puţin cunoscute. Se produc scăderi în: sarcină, boli infecţioase cronice (TBC, lepră), precum şi creşteri în reumatismul acut şi stările de hemoliză.

Nichelul şi cobaltul sînt, în ultimul timp, studiate cuplat cu patologia bolilor cardio-vasculare.

6.2.5.4. *Nichelul* se găseşte în plasmă în cantitate de 0,002—0,0238 μmoli (1,2—4,6 μg/l), legat de albumine şi α_2-macroglobuline. Variaţiile patologice care au atras atenţia — în mod special — sînt creşterile din infarctul miocardic acut. Se cunosc scăderi în ciroza hepatică şi uremie. Metodologia cea mai recomandată se bazează pe spectrofotometrie de absorbţie atomică.

6.2.5.5. *Cobaltul.* În ser este vehiculată o cantitate de 0,02—0,61 μ moli (1,2—36 u g)/litru. Elementul este legat ca ion în vitamina B_{12} (vezi cap. XX), funcţionînd ca efector al multor enzime (activator sau inhibitor), în funcţie de concentraţie. Co se dozează prin spectrofotometrie de absorbţie atomică sau analize cu activare neutronică. Deşi din punct de vedere biochimic cobaltul este puţin studiat, se cunoaşte însă bine acţiunea sa cardiotoxică.

7. COMPONENTE ORGANICE CU GREUTATE MOLECULARĂ MICĂ

7.1. SUBSTANŢE AZOTATE NEPROTEICE

7.1.1. AZOTUL NEPROTEIC

Substanţele azotate neproteice reprezintă produşi intermediari sau finali ai proceselor metabolice. Considerate în ansamblu, aceste substanţe alcătuiesc aşa numitul azot neproteic ce cuprinde: uree (50% din total),

acid uric, creatină, creatinină, aminoacizi, amoniac, nucleotide, purine, polipeptide. În azotul neproteic se poate să fie cuprinse şi glicoproteine (ca orozomucoidul perclorosolubil). Evaluarea azotului neproteic se face în filtratul obţinut prin defecarea serului sau plasmei (cu acid tricloracetic, acid percloric, acid fosfotungstic, acid sulfuric, hidrat de zinc, acid sulfosalicilic, solvenţi organici ca alcool etilic, acetonă).

Diferenţa între azotul neproteic plasmatic şi azotul ureic constituie aşa-numitul azot restant (sau rezidual). Concentraţia azotului neproteic variază între 20—35 mg%. Se dozează kjeldahlometric sau colorimetric, pe baza reacţiilor de culoare a amoniacului; în practica medicală curentă metoda nu se mai foloseşte. Azotul neproteic este crescut în insuficienţa renală şi azotemiile extrarenale, prin creşterea compensatorie a concentraţiei ureei, în sindroamele cu tulburări electrolitice.

7.1.2. UREEA

Ureea este produsul final al metabolismului proteic la speciile ureotelice. Ea este produsă în ficat prin ciclul ureogenic (capitolul XI). Producerea ureei în ficat face parte din „biosintezele de excreţie" reprezentînd unul din mecanismele principale de detoxificare a amoniacului. Metodologia de dozare a ureei se bazează pe o reacţie enzimatică de descompunere a ureei prin uree în CO_2 şi NH_3, urmată de reacţia de culoare albastră (indofenol) cu hipoclorit-fenol (Berthelot) sau reacţia Nessler (culoare galben-cărămizie); reacţie de culoare roşie cu diacetilmonoximă (DAM); gazometric, prin oxidarea ureei cu hipobromit (metoda Kowarsky — Alin Popescu); prin test optic spectrofotometric, cuplat cu reacţia auxiliară şi reacţia indicatoare, din amoniac, acid α-oxoglutaric, glutamatdehidrogenază, NADH dependentă; test rapid orientativ de tip urastrat (Goedeke), uranal (Feinchemie-Sebnitz), bazate pe reacţii de culoare cu verde de brom-crezol. Se produc creşteri ale ureei în insuficienţa renală, degradarea excesivă de proteine, tumori, iradieri, tratament cu citostatice, tetracicline, corticosteroizi), aport excesiv de proteine alimentare, sindroame cu dezechilibru hidro-electrolitic (azotemie extrarenală).

7.1.3. CREATINA

Creatina are concentraţia de 3—7 mg/l (25—35 μmoli/l), ceea ce reprezintă doar o parte din totalul de 30 mg/l din sîngele total, eritrocitul fiind de fapt deţinătorul principal. Creatina se explorează rar (şi mai ales în urină) în atrofiile musculare şi hipertireoze. Pentru dozare poate fi folosită reacţia enzimatică cu CPK şi ATP.

7.1.4. CREATININA

Creatinina (amida internă a acidului metil-guanidinacetic) este cel mai fix constituent azotat al sîngelui, neinfluenţat de alimentaţie şi fiind corelat cu metabolismul muscular. Se dozează prin metoda colorimetrică bazată pe reacţie Jaffé, cu acid piric în mediul alcalin. Specificitatea reacţiei poate fi mărită prin măsurarea intensităţii de culoare în primele 10 minute, prin defecare, separare pe reactiv Loyd, sau extracţie în eter a celorlalte componente Jaffé-pozitive (acid ascorbic, acetonă acid α-cetoglutaric, glucoză, barbiturice, bilirubină, acid uric, PAH). Valorile normale sînt cuprinse în-

Scanned with OKEN Scanner

tre 62—97 μ moli/l (7—11 mg/l); la femei valorile sînt mai mici 44—88 μ moli/l (5—10 mg/l). Nivelul creatininei serice este un indicator sensibil al funcției renale păstrînd și proporționalitatea cu „Clearence-ul" creatininei endogene.

7.1.5. ACIDUL URIC

După cum s-a arătat, acidul uric este de proveniență endo- și exogenă, produs final al catabolismului purinic. El are un maxim de solubilitate plasmatică, ce corespunde la 381 μ moli (64 mg/l), mărit prin legarea cu proteinele. În mare majoritate (99%) acidul uric se găsește sub formă de urați de sodiu iar restul ca acid uric liber. Plasma conține și o glicoproteină ce leagă urații. Concentrația normală a acidului uric în plasmă este de 356 μ moli/1 (60 mg/l) la femei și 386 μ moli/l (65 mg/l). Patologic, se produc variații ale concentrației acidului uric din plasmă: hiperuricemii — primare (sau înnăscute) și secundare — și mult mai rar hipouricemii. Dintre hiperuricemiille primare pot fi reținute două: guta care se produce prin creșterea sintezei de acid uric cu scăderea capacității de legare a uraților la proteinele plasmatice și eliminării urinare. Ea se asociază cu predispoziția la litiaza urică sau cu hiperlipoproteinemia de tip IV, cu ateroscleroza prematură. A doua manifestare înnăscută a hiperuricemiei este sindromul Lesch-Nyhan, boală metabolică ce apare în special la băieți, fiind determinată prin deficitul de hipoxantin-guanin-fosforibozil-transferaza. Concentrația acidului uric plasmatic crește sau rămîne în limite normale, dar concentrația în LCR este mult crescută. Hiperuricemiile secundare se produc prin hiperproducție de acid uric, leucoze, policitemie, cură de slăbire, limfogranulomatoză, plasmocitom. În scăderea eliminărilor renale (insuficiență renală) sau hipertrigliceridemie, prin medicamente, scăderea clearence-ului, prin clorotiazidă, spironolactonă sau degradarea nucleoproteică ridicată (tratament cu busulfan, mercaptopurine, vincristin) sau administrare de medicamente cu acțiune nefrotoxică (gentamicină, fenotiazină, triamteren), catabolism purinic crescut. Hipouricemiile sînt rare; se cunoaște însă defectul enzimatic înnăscut în hipuricemia cu xantinurie prin defecte de xantinoxidază.

Metodica de dozare a acidului uric în ser este principal, colorimetrică, avînd la bază fie reacții chimice cu formare de albastru de wolfram, fie reacție enzimatică cu uricază urmată de reacție cromogenă auxiliară. Aceasta are la bază oxidarea unui cromogen de către H_2O_2 generată de prima reacție, cea enzimatică.

7.1.6. AMONIACUL ȘI AMINOACIZII

a) *Amoniacul plasmatic* provenit din degradarea componentelor azotate — proteine, baze purinice și piridinice, aminoacizi — ce se găsește liber în plasmă, în concentrații foarte mici 29 μ moli/l (660 mg/l). Patologic, concentrația amoniacului plasmatic crește în encefalopatia provocată prin suprimarea funcției detoxifiante a ficatului și în sîngerările gastrointestinale prin creșterea putrefacției intestinale. În patologia ereditară a unor aminoacizi (deficit enzimatic localizat în ciclul ureic) se produc creșteri. Metodica de dozare: colorimetric cu reactiv Berthelot (sau Nessler) sau test spectrofotometric cu reacția auxiliară cu acid α-cetoglutaric GLDH și NADH).

b) Nivelul de concentrație plasmatică a aminoacizilor liberi, exprimă echilibrul dintre aportul alimentar, utilizarea aminoacizilor în biosinteze — pro-

teine, pirimidine, catecholamine, creatină, porfirine și alți compuși azotați — degradarea lor — prin dezaminare oxidativă, transminare, decarboxilare, eliminarea în circulație și eliminarea renală. Concentrația plasmatică a acizilor aminați liberi este de ordinul 200 mg/l. În tabelul XIV. 7 sînt indicate concentrațiile aminoacizilor liberi în plasmă. Variațiile patologice ale acestora țin, în bună parte, de erorile înnăscute ale metabolismului, încadrîndu-se în sindroame de mare severitate, asociate de cele mai multe ori cu debilitate mintală și incompatibile cu viața. Ca patogenie, hiperaminoacidemiile se produc prin inhibiția sistemului de transport tubular sau tulburare

Tabelul XIV.7

Concentrația aminoacizilor plasmatici liberi (în mg/l)

Aminoacidul	nou născut		adult	
	valoare medie	limite	valoare medie	limite
1	2	3	4	5
Alanina	29,4	21,0—36,5	30,7	22,2—44,7
β-Alanina	1,3	—	0,8	—
Acid α-aminobutiric	1,5	0,6—3,0	1,7	1,0—2,4
Arginina	9,4	3,8—15,3	14,3	8,6—26,3
Asparagina	6	—	5,7	—
Acid aspartic	1,1	urme 2,2	2,2	urme 7,2
Etanolamină	3,2	1,6—5,6	0,1	urme 0,7
Citrulina	2,8	1,5—5,0	5,3	2,1—9,7
Cisteina	14,7	8,5—20,2	11,7	11,5—33,7
Fenilalanina	13	6,9—18,2	9,5	6,2—19,2
Glutamina	112	79 —140	83	61 —102
Acid glutaminic	7,6	3,0—15,7	8,6	2,5—17,3
Glicina	25,8	16,8—38,6	17,4	10,8—36,6
Histidina	11,9	7,6—17,7	12,4	9,7—14,5
Hidroxiprolina	4,2	—	9,2	0,69—1,20
Izoleucina	5,2	3,5—6,9	7,1	4,6—11,5
Leucina	9,5	6,1—14,3	13,2	9,3—17,8
Lizina	29,3	16,7—39,3	25,4	21,1—30,9
Metionina	4,4	1,3—6,1	3,2	2,3—3,9
Ornitina	12,1	6,5—20,0	9,2	4,3—16,7
Prolina	21,3	12,3—31,9	27,1	12,8—51,4
Serina	17,2	9,9—25,5	11,8	6,8—20,3
Taurina	17,6	9,3—27,0	8,3	5,6—17,3
Tirozina	12,6	7,6—18,0	9,1	6,5—11,3
Treonina	25,9	13,6—39,9	19,4	12,2—29,3
Triptofan	6,5	urme 13,7	9,8	5,1—14,9
Valina	16	9,4—28,8	19,9	13,6—26,6

generalizată a funcției tubulare sau deficit enzimatic strict localizat. Mecanismele de transport se pot tulbura, fie pentru un anumit grup specific (aminoacizi bibazici, iminoacizi) fie pentru unul singur (lizina, cistina, glicina). În aminoaciduriile prin defect tubular, nu se schimbă nivelul plasmatic al aminoacizilor. Metodica de studiu este bazată pe: cromatografie pe hîrtie sau cromatografie în strat subțire, pe plăci cu celuloză. Ca revelatori se folosesc: ninhidrina (culoare violet), izatina (culoare albăstruie), acidul sulfanilic diazotat sau reactivul Pauli pentru tirozină și histidină (culoare roșie); cromatografie pe schimbători de ioni (procedee automatizate).

Scanned with OKEN Scanner

7.1.7. POLIPEPTIDE

Polipeptidele se găsesc în cantitate mică în plasmă, provenind din degradarea incompletă a proteinelor. Exprimate în N-polipeptidic, conținutul plasmatic al lor este 3—4 mg%. Această concentrație crește după arsuri grave, întinse sau în șocul postoperator. Polipeptidele se dozează prin metoda „dublului azot" (după Kjeldhalizare). În prezent asemenea analize sînt foarte rar solicitate.

7.1.8. BILIRUBINA

Bilirubina este alcătuită în mare proporție (80%) din bilirubina primară, neconjugată, legată de albumină și parțial de complexul albumină-fosfatide (în proporții mai mici de peptide aminoacizi). Bilirubina directă, mono- și diglucuronată (prin acțiunea UDP-glucuronil-transferazei la nivelul ficatului), este în concentrație mică în plasmă. Concentrația normală în plasmă a bilirubinei totale se ridică pînă la 17 μ moli/l (10 mg); din care 1/5 este directă. Variațiile patologice sînt indicate în Cap. XVI. Metodica de dozare este principal, colorimetrică — pe baza reacției de cuplare cu reactivul diazo-acid sulfanilic — cu formare de azobilirubină, roșie în mediu acid, albastră, în mediu alcalin, sau prin reacție cu 2—Cl—, 4—nitro-anilină diazotată.

7.2. SUBSTANȚE ORGANICE NEAZOTATE

7.2.1. GLUCOZA

Nivelul plasmatic al glucozei este o rezultantă a complexului mecanism homeostatic în care intervin factori endocronoenzimatici (Cap. IX). Glucoza plasmatică se găsește sub formă dializabilă, fie ca glucopiranoză, fie ca glucofuranoză (după unii autori). O foarte mare parte este legată de moleculele proteice, constituind așa numitul zahăr protidic. Glucoza plasmatică provine din alimentație, glicogenoliză (ficat, mușchi), gluconeogeneză (ficat, rinichi). Nivelul normal al concentrației glucozei în plasmă, este stabilit în funcție de dozare, bazat fie pe oxidoreducere, fie pe reacția enzimatică cu glucozoxidază. Metodele bazate pe reacții de oxidoreducere dau valori normale cuprinse între 700—1 200 mg/l iar cele enzimatice specifice 600—900 mg/l. Valorile acceptate ca normale (media diferitelor variante), sînt: 600—1 000 mg/l sau 3,33—5,55 m moli/l. Valori mai mari de 1 300 mg/l sau 7,22 m moli/l aduc suspiciunea de diabet. Variațiile patologice descrise (Cap. IX) se manifestă principal în diabetul zaharat, iar hipoglicemiile se pot întîlni în: hiperinsulinism, hipoglicemia familială, sensibilă la leucină, tulburări de resorbție renală (fără hiperinsulinism), boli de ficat (scăderea glicogenogenezei și a gluconeogenezei), insuficiență suprarenală, deficit de fructozo-1-fosfat-aldolază sau fructozo-1,6-difosfat-aldolază, galactozemii, glicogenoze și în unele procese neoplazice (hepatoame, tumori ale corticalei suprarenale, teratoame). Metodica de dozare se bazează în special pe reacții de oxidoreducere (Folin-Wu, Hagedorn-Jensen, dozările sînt influențate de medicamente ca: penicilina, streptomicina, tetraciclinele precum și de metaboliți ca: glutationul, acidul uric, corpii cetonici, creatinina, creatina. Metodele bazate pe oxidoreduceri dau valori mai ridicate pentru glicemie decît cele obținute prin metode enzimatice. Metoda cu ortotoluidină, internațional standardizată, este bazată

Scanned with OKEN Scanner

pe formarea — în mediu acid — a hidroximetil-furfurolului provenit din glucoză care se condensează cu ortotoluidina. Din reacție rezultă un compus colorat în verde. În locul ortotoluidinei au fost folosite și alte amine aromatice (anilina, xilidina).

Metode enzimatice: a) cu glucozoxidază în care D-glucoza se transformă în gluconolactonă ce trece în acid gluconic cu producere concomitentă de H_2O_2. Deoarece în soluție glucoza este în proporție de 36% în forma α și în proporție de 64% în forma β, preparatele de glucozoxidază conțin și mutarotaza care aduce toată glucoza în formă β. Peroxidul de hidrogen (H_2O_2) este descompus prin peroxidază, oxidînd un indicator (donator de H) cromogen. Dintre acești indicatori redox se folosesc: 0-dianizidina (0-tolidina)*, sau fenol-4-amino-fenazona sau acid 2, 2′ azino-di- (—3-etil-benzotiazolin-sulfonic)** b) metoda cu hexokinază și GL6PDH, NADP dependentă ca test optic; c) metoda cu hexokinază, cuplată cu entalpimetrie; d) teste rapide (tip Haemo-Glukotest, Detrostix, Dextronal) bazate pe reacția cu glucozoxidază.

7.2.2. COMPUȘI LIPIDICI

Principalele componente lipidice au fost prezentate la 5.4.1., datele referindu-se la următorii constituenți: colesterol, trigliceride, acizi grași liberi, fosfatide. În cele ce urmează sînt redate unele aspecte legate de principalii derivați ai colesterolului, anume *acizii biliari*. Se găsesc în serul normal în concentrații foarte mici și variabile cu metoda. Acizii: colic, dezoxicolic și chenodezoxicolic ating în ser concentrații cuprinse între 0,4—7 mg/1. Ca și în bilă acizii biliari din ser sînt în majoritate conjugați cu taurină și glicocolul. Creșterea concentrației lor în ser, se produce atît în icterele obstructive — prin obstacol extra sau intrahepatic — cît și în icterele hepatocelulare.

Metodica de investigare este laborioasă. După extracție etanolică din ser se poate aplica cromatografia în strat subțire, pentru separarea de celelalte componente lipidice. Pentru studii de mare precizie se aplică cromatografia în fază gazoasă, după derivatizarea lor ca trimetilxililesteri. Controlul datelor se poate face și prin spectrometria de masă. În chimia clinică se practică dozarea prin colorimetrie, pe baza reacției de culoare cu acid sulfuric sau se aplică spectrofotometria, ca test optic cu 3α-hidroxisteroid-dehidrogenaza. Dozarea evaluează totalitatea acizilor 3 α-hidroxibiliari, cu 19, 21 sau 24 atomi de carbon.

7.2.3. ACIZII ORGANICI

Acidul lactic. Acest important produs al glicolizei anaerobe este prezent în ser în concentrație de 1—1,5 mEq/l sau 9—15 mg/100 ml. Valorile de concentrație sînt în funcție de metodă și de starea de repaus sau de efort care a precedat prelevarea sîngelui. Provine mai ales din eritrocite și din mușchi, elemente cu intensă glicoliză anaerobă. Se cunosc creșteri în hepatopatii, insuficiența cardiacă sau după eforturi fizice foarte grele.

Metodica de dozare: *colorimetric*, prin transformarea acidului lactic în acetaldehidă, care formează în prezența ionilor de Cu, un complex colorat cu parahidroxi-difenilul; *spectrofotometric* prin test optic cu LDH-NAD de-

---

* În ultimul timp se folosește tetrametil-benzidina.
** prescurtat ABTS

Scanned with OKEN Scanner

Principalele componente plasmatice exprimate în unităţi de greutate şi în noile unităţi de măsură m moli/1 şi μm/1. (S.I).

Componente	Valori normale în unităţi de greutate/100 ml	Factorii de transformare V.g→V.mol U.g←U.mol	Valori normale în unităţi molare
1	2	3	4
Cationi			
Na^+	315—340 mg	0,435→ ←2,30	137—147 mmol/l.
K^+	14—21 mg	0,256→ ←3,91	3,6—5,4 mmol/l.
Ca^{++}	9,0—10,8 mg	0,25→ ←4,01	2,3—2,7 mmol/l
Mg^{++}	1,9—2,5 mg	0,411→ ←2,43	0,8—1,0 mmol/l
Anioni			
Cl^-	344—395 mg	0,282→ ←3,545	94—111 mmol/l
P_i adult	2,5—4,8 mg	0,323→ ←3,100	0,8—1,6 mmol/l
copil	4—7 mg		1,3—2,3 mmol/l
Componente organice azotate			
Ureea	20—40 mg	0,1665→ ←6,006	3,3—6,7 mmol/l
Creatinina ♂	0,7—1,1 mg	88,4→	62,0—97,0 μmol/l
♀	0,6—0,9 mg	←0,0113	53,0—80,0 μmol/l
Acid uric ♂	2,5—7 mg	59,485→	149—416 μmol/l
♀	1,5—6 mg	←0,0168	89—357 μmol/l
Bilirubina totală	<1 mg	17,1→	<17,1 μmol/l
Bilirubina directă	<0,25 mg	←0,0585	<4,3 μmol/l
Componente organice neazotate			
Colesterol	<260 mg	0,0259→ ←38,7	<6,7 mmol/l
Trigliceride	<150 mg	0,0141→ ←87,5	<1,7 mmol/l
Glucoză	50—100 mg	0,0555→ ←18,02	2,8—5,6 mmol/l
Piruvat	0,36—0,59 mg	114→ ←0,0088	41—67 μmol/l

Scanned with OKEN Scanner

Tabelul XIV.8 (continuare)

Componente	Valori normale în unităţi de greutate 100 ml	Factorii de transformare V.g→V.mol U.g←U.mol	Valori normale în unităţi molare
1	2	3	4
Oligoelemente			
Fe^{++} ♂	60—160 μg	0,179→	10,6—28,3 μmol/l
♀	40—145 μg	←5,585	6,6—26,0 μmol/l
Capacitatea totală de legare a Fe în ♂	300—400 μg	0,179→	54—72 μmol/l
transferină (TIBC) ♀	250—350 μg	←5,585	45—63 μmol/l
Cu^{++} ♂	70—140 μg	0,1574→	11—22 μmol/l
♀	85—155 μg	←6,355	13—24 μmol/l

pendentă, piruvatul fiind captat prin transformare în hidrazonă, iar H^+ într-un tampon puternic alcalin.

Acidul piruvic. Deşi acest acid reprezintă o „placă turnantă" a metabolismului intermediar — glucido, lipido, proteic — el are o concentraţie mică de 0,9—1,2 mg% sau 0,146—2 DS mMoli/l. Creşte în deficienţa de vitamina B_1 în cursul exerciţiilor fizice grele şi în alcoolism. În hipoxie este convertit în acid lactic.

Metodica de dozare: *colorimetric*, prin metoda hidrazonelor; *spectrofotometric* prin test optic cu LDH şi $NADH_2$.

Acidul guanidino-succinic se găseşte în ser în concentraţii ce pot atinge 1 mg/l. În insuficienţa renală creşte mult, nivelul său atingînd 90 mg/l. Se poate separa cromatografic şi doza prin reacţia Sakaguchi, cu α-naftol şi hipoclorit de sodiu (culoare roşie).

7.2.4. CORPII CETONICI

La normal sînt prezenţi în concentraţie foarte mică. Acetil-acetul are concentraţia cuprinsă între 18—78 μmol/l iar β-hidroxibutiratul între 58—170 μmoli/l. Valoarea globală a corpilor cetonici serici, exprimaţi în acetonă este de 1,5—35 mg%. Creşteri însemnate sînt determinate prin scăderea glucozei intracelulare sau a utilizării sale (diabet, inaniţie). Metodica de dozare este principal colorimetrică, bazată pe reacţia de culoare roşie pe care acetona o dă cu aldehida salicilică. Se formează disalicilacetonă, din acetona preexistentă, cît şi din cea produsă din acidul acetil-acetic şi din acidul β-hidroxi-butiric prin decarboxilare şi respectiv prin oxidare.

Deoarece în biochimia medicală modernă se conturează tendinţa introducerii noilor unităţi de măsurare cu exprimare în m moli şi μmoli a componentelor biologice, în tabelul XIV. 8 sînt redate principalele componente plasmatice, exprimate în acest mod, inclusiv factorii de transformare reciprocă între aceştia şi vechile unităţi de greutate.

Scanned with OKEN Scanner

Capitolul XV

BIOCHIMIA ŢESUTULUI CONJUNCTIV ŞI OSOS

1. ŢESUTUL CONJUNCTIV

Ţesutul conjunctiv este cel mai răspîndit ţesut din organism. El intră în primul rînd în constituţia oaselor, dinţilor, cartilajelor, fasciilor, tendoanelor, ligamentelor şi pielii. Ţesutul conjunctiv se află distribuit şi în organele moi (ficat, rinichi), fiind localizat între circulaţia sanguină şi celulele funcţionale din parenchimul organului respectiv.

1.1. STRUCTURA ŢESUTULUI CONJUNCTIV

Ţesutul conjunctiv este format dintr-o substanţă fundamentală în care se găsesc celule şi fibre elastice.

1.1.1. SUBSTANŢA FUNDAMENTALĂ

În esenţă, substanţa fundamentală este constituită din glicozaminoglicani sau mucopolizaharide acide şi proteine.

1.1.1.1. *Mucopolizaharidele acide.* Acestea conferă ţesutului conjunctiv proprietăţi fizice remarcabile: maleabilitate, elasticitate, vîscozitate. Ele îndeplinesc diverse şi multiple roluri în ţesutul conjunctiv respectiv. Cel mai remarcabil este rolul de a controla deplasările apei şi electroliţilor extracelulari, datorită faptului că sînt polianioni proveniţi din macromolecule cu numeroase grupări acide. Principalii constituenţi ai glicozaminoglicanilor din substanţa fundamentală sînt: *acidul hialuronic*, deosebit de abundent în umoarea sticloasă, lichid sinovial, tendoane, piele, cordon ombilical; *acizii condroitin sulfurici*, localizaţi în special în piele şi tendoane, *dermatan-sulfatul* din piele, tendoane, valvulele cardiace şi aortă, *cheratosulfatul* izolat din cornee şi cartilajul costal, *acidul heparin-sulfuric* aflat în mare cantitate în cornee. Studiul chimic al acestor substanţe a fost făcut anterior în Cap. IX, privind glucidele. În completarea cunoştinţelor referitoare la aceşti glicozaminoglicani, se fac unele precizări mai departe, la constituenţii chimici ai ţesutului conjunctiv.

1.1.1.2. *Proteinele.* S-au izolat iniţial două proteine: una extrasă cu acizi şi alta cu alcalii slabe. Faptul că ambele proteine precipită — în anumite condiţii — sub formă de fibre cu proprietăţi asemănătoare fibrelor de colagen, a făcut ca ele să fie considerate drept colagen acido-solubil şi colagen alcalino-solubil. Acesta din urmă ar putea fi considerat precursorul fibrelor de colagen.

Substanţa fundamentală cuprinde şi proteine serice, aşa cum conţine şi ioni minerali identici cu ai serului sanguin.

Scanned with OKEN Scanner

Cu ajutorul izotopilor radioactivi s-a dovedit că diversele proteine din substanţa fundamentală prezintă un metabolism foarte intens, stimulat de procese degradative proteolitice. Printre enzimele participante la aceste degradări din substanţa fundamentală, s-au pus în evidenţă unele hialuronidaze, colagenaza şi tripsina.

1.1.2. CELULELE

În funcţie de natura formaţiunii căreia îi aparţin, celulele ţesutului conjunctiv poartă denumiri diferite: *fibroblastele*, care predomină în fibrele de legătură; *condroblastele* care generează cartilajele, *osteoblastele* care participă la formarea oaselor etc. Este de remarcat faptul că celulele de acelaşi fel — spre exemplu, fibroblastele — se diferenţiază după cum sînt celule din constituţia unui element de legătură sau din peretele arterial. Aceste diferenţieri ţin de proporţiile în care intră cele patru tipuri de macromolecule constitutive: colagen, elastină, proteoglicani polianionici şi glicoproteine structurale (vezi mai departe, constituenţii chimici ai ţesutului conjunctiv).

În general, celulele ţesutului conjunctiv sînt reunite între ele prin prelungiri. Întreg ansamblul astfel format constituie o veritabilă reţea în interstiţiile căreia se află fibrele elastice.

1.1.3. FIBRELE ELASTICE

În ţesutul conjunctiv există diverse tipuri de fibre elastice care se deosebesc între ele prin scleroproteinele constitutive: colagen, elastină, reticulină. Colagenul şi elastina sînt proteine cunoscute (vezi Cap. III privind proteinele), iar unele amănunte suplimentare se dau mai departe, la constituenţii chimici ai ţesutului conjunctiv. Reticulina este o scleroproteină asemănătoare colagenului dar diferă de acesta prin faptul că cuprinde şi poliozide.

Un fapt demn de relevat cu privire la structura ţesutului conjunctiv, este în legătură cu plasarea fibrelor elastice în substanţa fundamentală şi anume: fibrele elastice nu realizează un simplu contact cu substanţa fundamentală ci — datorită dispoziţiei constituenţilor lor chimici — se stabilesc numeroase legături între aceştia şi constituenţii substanţei fundamentale, ceea ce contribuie — fără îndoială — la rezistenţa deosebită a ţesutului conjunctiv.

1.2. CONSTITUENŢII CHIMICI AI ŢESUTULUI CONJUNCTIV

Din cele menţionate la structura ţesutului conjunctiv rezultă că principalele substanţe chimice care intră în constituţia acestui ţesut sînt anumite proteine şi anumite glucide. Deşi studiul chimic al acestor substanţe a fost prezentat în Capitolele III şi IX, unele date suplimentare — utile înţelegerii proprietăţilor particulare ale ţesutului conjunctiv — sînt menţionate în cele ce urmează.

1.2.1. PROTEINELE

Proteinele din constituţia ţesutului conjunctiv sînt scleroproteinele colagen şi elastină.

Scanned with OKEN Scanner

1.2.1.1. *Colagenul.* Cea mai importantă și cea mai abundentă proteină din organismul uman este colagenul (tabel XV. 1). După cum rezultă din tabelul XV.1 organele moi, ca ficatul, cuprind puțin colagen; în schimb, organele

Tabelul XV.1

Concentrația colagenului, elastinei și proteoglicanilor polianionici în unele organe (g/100 g țesut uscat)

Țesut	Colagen	Elastină	Proteoglicani polioanionici
Ficat	3,9	0,16—0,30	—
Plămîni	10,0	3—7	—
Aortă	12—34	28—32	5,9
Cartilaj	46,1—63,7	—	20,4—37,1
Cornee	68,1	—	4,5
Piele	71,9	0,6	—
Tendonul lui Achile	86	4,4	0,5
Oase (în totalitate)	22,8	—	0,2
Oase (demineralizate)	88	—	0,8

de tipul pielii și tendoanelor cuprind colagen mai mult de 70% (din greutatea lor uscată). În cazul osului, deși colagenul reprezintă numai 23% din masa uscată, această cantitate corespunde la aproximativ 90% din matricea lui organică.

Cea mai importantă funcție a colagenului în organism este de a conferi rezistență și de a păstra integritatea structurală a țesuturilor în constituția cărora intră. Totodată, colagenul este unicul constituent al organismelor superioare, care prezintă rezistență la tracțiune. Aceasta este demonstrată de faptul că pentru ruperea unei fibre izolate de colagen, cu diametrul de 1 mm, este necesar să se tragă cu o greutate de 10—40 kg.

Pe baza unor studii mai vechi, a dăinuit multă vreme părerea că în organism colagenul, care se formează în cursul dezvoltării, rămîne pentru tot restul vieții. Aceasta revine la a spune că pentru colagen nu ar exista o stare dinamică de reînnoire, așa cum există pentru alte proteine. O serie de cercetări ulterioare au arătat însă că în diverse procese normale (involuția uterului după naștere, vindecarea rănilor) și patologice (scorbut) colagenul este supus unor importante procese metabolice de biosinteză sau degradative. De altfel, cauzele multor maladii — printre care diabetul zaharat și ateroscleroza — sînt explicate, în mare măsură, prin modificările survenite în metabolismul colagenului.

a) *Biosinteza colagenului* este astăzi un proces bine cunoscut. Ea presupune parcurgerea a 10 etape ce se succed într-o secvență bine ordonată și care permit trecerea de la aminoacizi liberi la fibrila de colagen. Aceste etape sînt următoarele: 1) asamblarea aminoacizilor; 2) hidroxilarea unor resturi de prolină (prolil) și de lizină (lizil); 3) formarea helixului; 4) glicozilarea; 5) expulzarea din celulă; 6) transportul la fibrila în creștere; 7) transformarea procolagenului în colagen; 8) formarea aldehidelor; 9) formarea fibrilei; 10) stabilirea legăturilor încrucișate.

Reunirea aminoacizilor are loc în fibroblaste, trecîndu-se prin aceleași etape prin care se biosintetizează toate proteinele. Este caracteristic însă faptul că printre aminoacizii constitutivi predomină glicocolul. Într-o măsură

Scanned with OKEN Scanner

mai mică se află prolina, iar într-o proporţie şi mai redusă se află lizina. Procesul de asamblare decurge rapid: 200 aminoacizi/minut. Aceasta înseamnă că biosinteza unei catene de 1 000—1 100 aminoacizi are loc în 5—6 minute.

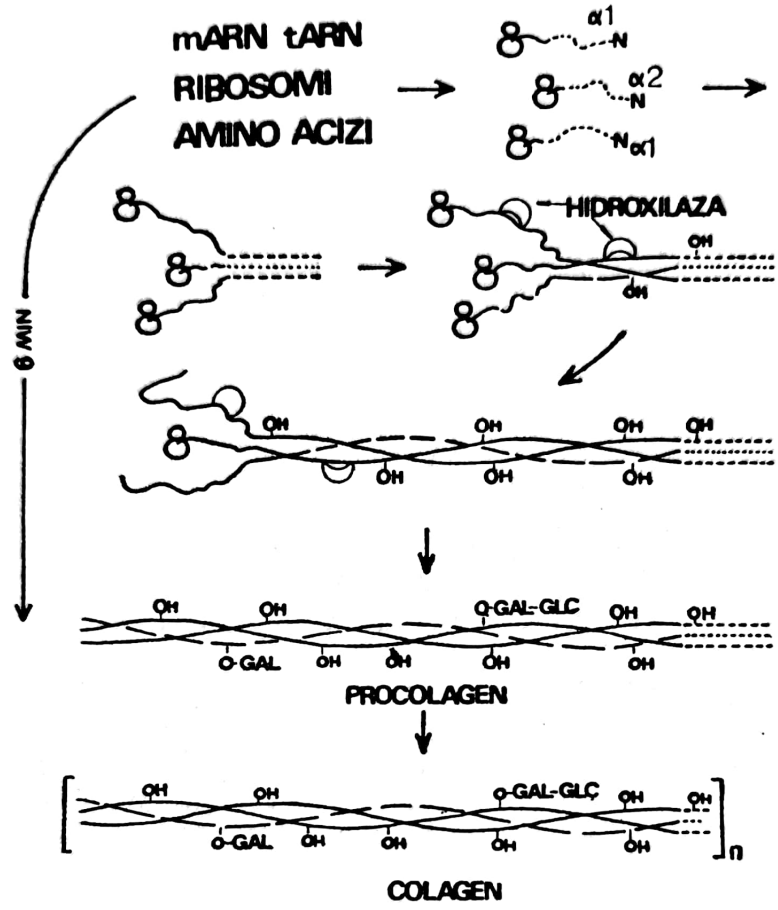


Fig. XV.1. Reprezentarea schematică a biosintezei colagenului.

Hidroxilarea unor resturi de prolină şi lizină se face în prezenţa anumitor enzime şi începe încă din etapa în care catenele polipeptidice aflate în formare sînt ataşate de ribozomi. Apar astfel în catena polipeptidică resturi de hidroxiprolină şi hidroxilizină, alături de aminoacizii menţionaţi.

Catenele polipeptidice rezultate iau conformaţia de α-helix şi de aceea se numesc α-catene. Deoarece secvenţele de aminoacizi şi hidroxilările la nivelul resturilor prolil şi lizil nu sînt identice în toate lanţurile polipeptidice, se constituie — în genere — două feluri de α-catene, numite respectiv α_1-catene şi α_2-catene. Acestea sînt totuşi omologe fiind formate din cca 1 050 resturi de aminoacizi şi avînd în multe poziţii, secvenţe identice. Deoarece α-catenele cuprind fiecare mai mult de 1 000 aminoacizi, m-ARN-ul participant la biosinteza acestor lanţuri polipeptidice lungi este foarte mare. De fapt, şi acest m-ARN are greutate moleculară de cca 1 milion, fiind cel mai mare m-ARN cunoscut. (Fig. XV. 1).

În stadiul de α-catenă colagenul se mai numeşte şi tropocolagen. Trebuie remarcat faptul că α-catenele din constituţia colagenului se deosebesc de α-helixurile altor proteine, fiindcă au pasul mai mare (sînt mai „întinse").

Distanța dintre doi aminoacizi, măsurată în lungimea axei helixului, este de 2,86 Å, față de 1,5 Å din α-helixurile obișnuite. Pe de altă parte, α-catenele colagenului nu cuprind legături de hidrogen intracatenare. Ele sînt însă sta-

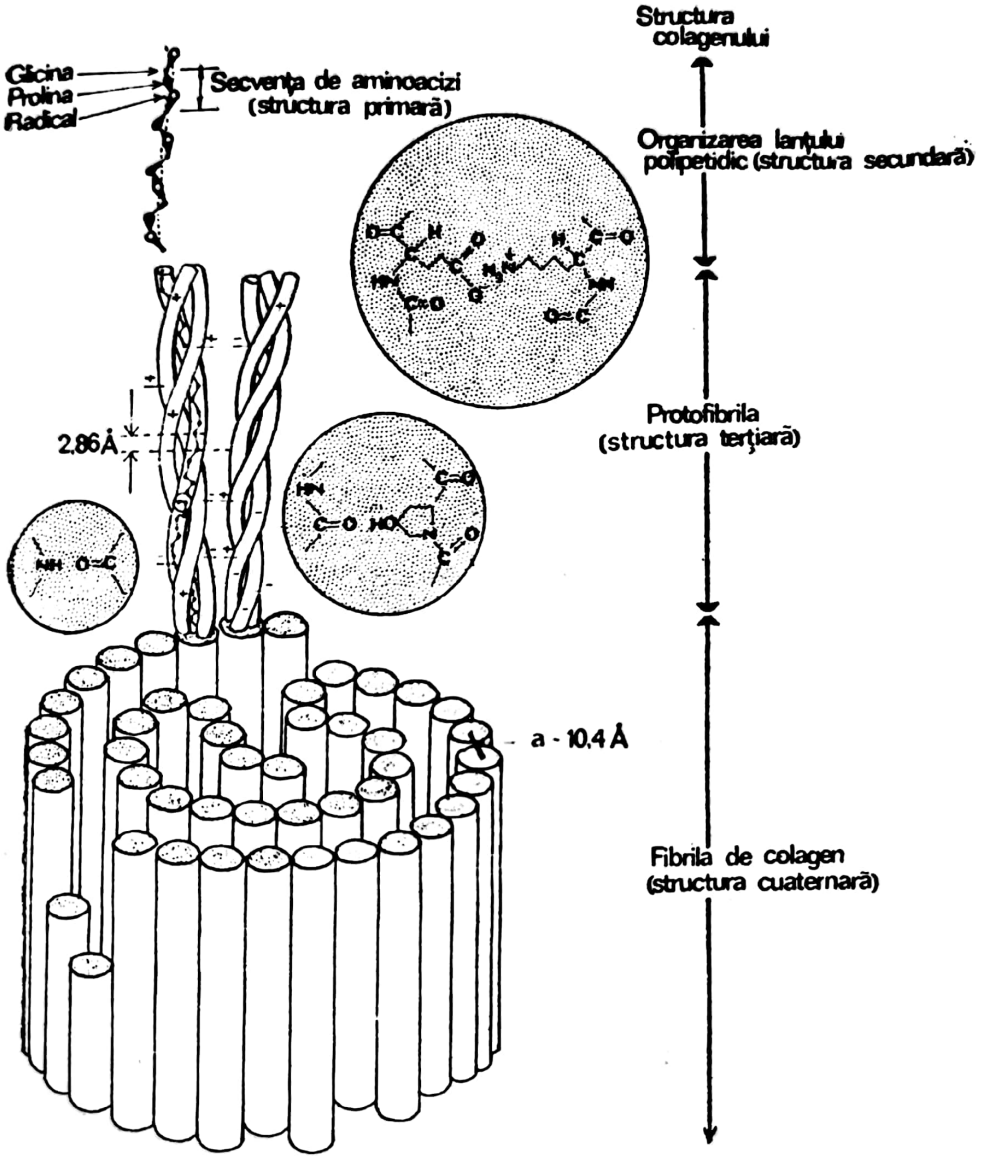


Fig. XV.2. Structurile primară, secundară, terțiară și cuaternară ale colagenului.

bilizate prin legături de hidrogen intercatenare. Într-adevăr, în asocierea spontană a 3 catene ($3\alpha_1$) sau ($2\alpha_1$ și $1\alpha_2$) și împletirea lor una asupra alteia, cele trei catene devin strîns unite prin legături de hidrogen. Formațiunea astfel constituită se dispune helicoidal în spațiu, rezultînd un superhelix cu pasul de 28,6 Å. În regiunile terminale superhelixul are α-catenele dispuse paralel, neîmpletite una asupra alteia. În ansamblu, aceasta este structura moleculei de colagen care fiind încă în stadiul de formare intracelulară, se numește procolagen (fig. XV. 2).

La grupele OH din hidroxilizina aflată în unele poziții ale α-catenelor din tropocolagen se leagă glicozidic resturi constituite din glucoză și galactoză

(glicozil-galactoza). Această glicolizare precede imediat sau se face chiar simultan cu expulzarea (sau „secreția") din celulă fig. XV. 3.

Expulzarea procolagenului din fibroblast are loc printr-un mecanism încă necunoscut.

În spațiul extracelular procolagenul pierde unele resturi peptidice, neîmpletite, de la capătul N-terminal al α-catenelor sub acțiunea hidrolizantă a procolagen-peptidazei. Ulterior, moleculele rezultate se asociază în microfibrile care se dispun paralel fiind stabilizate prin legături covalente.

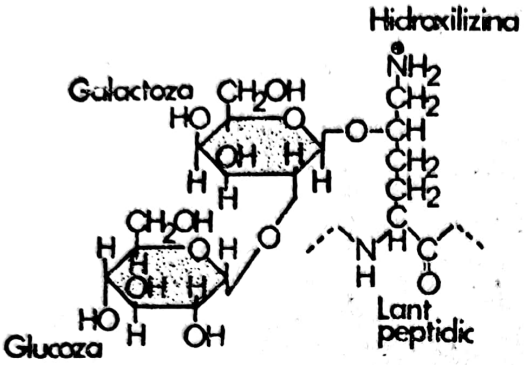


Fig. XV.3. Unirea entității dizaharidice cu grupul hidroxil al restului de hidroxilizină din catena polipeptidică.

În urma acestor procese, în spațiul extracelular, procolagenul este transformat în colagen (nativ). Molecula de colagen are forma unui bastonaș solid cu diametrul de 15 Å și lungimea de 3 000 Å. Pentru a se putea da seama de marea disproporție dintre aceste dimensiuni — și deci de aspectul moleculei de colagen — este suficient să se facă referirea la modelul realizat prin mărirea de 10 milioane ori a dimensiunilor. Rezultă, în acest caz, un baston cu diametrul de 1,5 cm și lungimea de 3 m.

Mai multe microfibrile, vizibile numai la microscopul electronic, se asociază — la rîndul lor — constituind fibrilele de colagen, vizibile la microscopul optic iar din reunirea mai multor fibrile rezultă fibra de colagen, vizibilă cu ochiul liber.

Asocierea moleculelor de colagen în formațiuni fibrilare (microfibrile, fibrile, fibre) se realizează pe baza unor legături inter- și intra-moleculare. Printre acestea, în mare măsură contribuie și cele stabilite așa cum se explică mai departe.

Din regiunile terminale, neîmpletite, ale superhelixurilor anumite resturi de lizină și hidroxilizină sînt dezaminate sub acțiunea unei enzime numită lizilaminoxidaza, activată de cupru. În urma acestei dezaminări oxidative apar aldehidele corespunzătoare:

$$P-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-NH_2 \rightarrow P-CH_2-CH_2-CH_2-C\begin{matrix}H\\ \diagup\\ \diagdown\\ O\end{matrix}$$

rest lizină — rest allizină

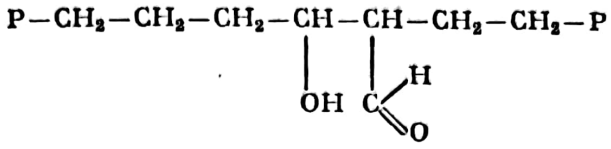
$$P-CH_2-CH_2-\underset{\displaystyle OH}{\underset{|}{CH}}-CH_2NH_2 \rightarrow P-CH_2-CH_2-\underset{\displaystyle OH}{\underset{|}{CH}}-C\begin{matrix}H\\ \diagup\\ \diagdown\\ O\end{matrix}$$

rest hidroxilizină — rest alhidroxilizină

în care P = restul catenei polipeptidice.

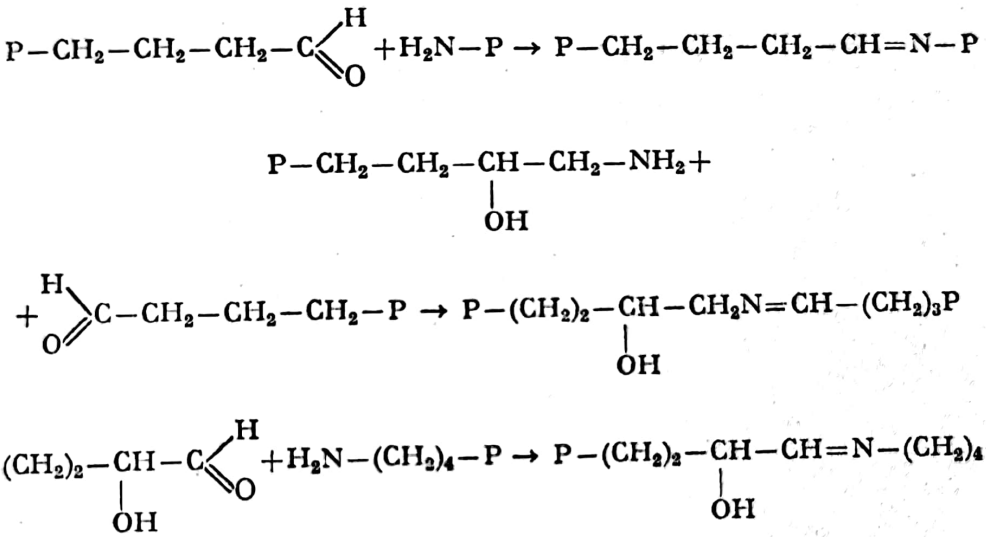
Aldehidele rezultate sînt reactive, se condensează aldolic între ele sau se condensează cu grupările aminice libere din radicalii lizinei și hidroxilizinei formînd aldimine (baze Schiff). Ambele genuri de condensări se stabilesc, atît intramolecular (între α-catenele aceluiași superhelix), cît și intermolecular (între α-catenele din superhelixuri diferite).

Intramolecular, condensarea aldolică între două resturi de alizină (aldehida lizinei), are loc astfel:



și conduce la stabilirea de legături transversale între α-catenele aceleiași molecule.

Intermolecular, condensarea allizinei, hidroxilizinei sau a hidroxiallizinei cu grupare aminică liberă din radicalul unui aminoacid diaminomonocarboxilic are loc astfel:



și conduce la stabilirea de legături încrucișate (cross linking) din fibrila de colagen (fig. XV. 4).

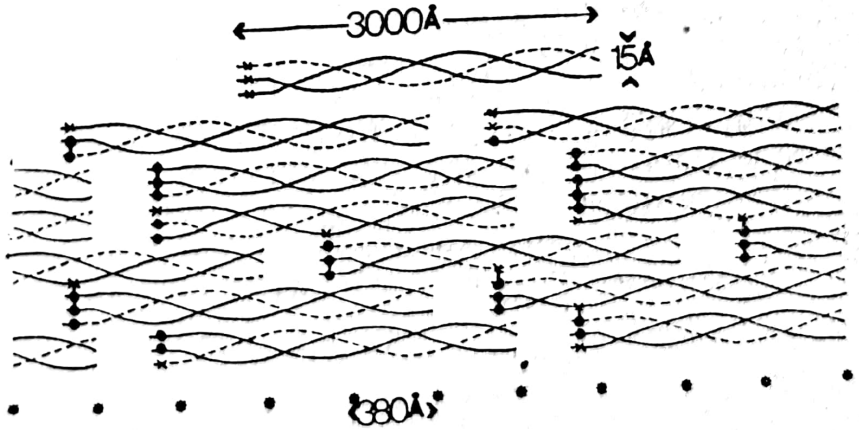


Fig. XV.4. Reprezentarea schematică a legăturilor încrucișate, intramoleculare (I) și intermoleculare (Y) din fibrele de colagen.

b) *Particularitățile structurale ale colagenului din diverse țesuturi.* Deși colagenul este biosintetizat în toate țesuturile în același fel, parcurgîndu-se cele zece etape menționate anterior, microfibrilele rezultate se dispun în mod deosebit în diverse organe. Astfel, în tendoane formațiunile fibrilare (micro-

fibrile, fibrile) sînt dispuse în mănunchiuri paralele; în piele microfibrilele sînt orientate într-un acelaşi plan iar în cartilaje ele sînt asociate cu proteoglicani astfel încît nu se mai pot recunoaşte microfibrilele individuale. O altă deosebire importantă în cazul colagenului din diverse organe sau ţesuturi se referă la diametrul microfibrilelor. Spre exemplu, el este de 150—250 Å în

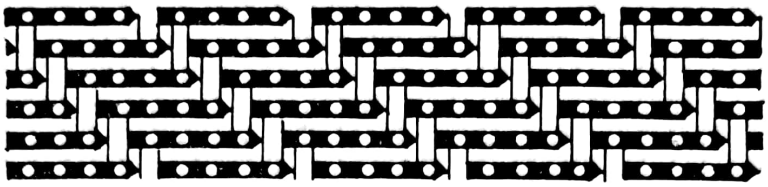


Fig. XV.5. Formarea fibrilei de colagen prin reunirea şi aşezarea periodică a moleculelor.

cartilaje, 300 Å în cornee, 600 Å în piele şi 300—1 300 Å în tendoane. De asemea, odată cu înaintarea în vîrstă, diametrul microfibrilelor de colagen din diverse ţesuturi creşte apreciabil, putînd ajunge pînă la valoarea maximă de 2 000 Å.

Indiferent de ţesutul sau organul căreia îi aparţin, microfibrilele de colagen prezintă dungi transversale caracteristice, distanţate la cca 700 Å. Periodicitatea acestor dungi rezultă din ordonarea specifică (cap la coadă) şi paralelă a elementelor structurale din microfibrile, moleculele de colagen (fig. XV. 5).

c) *Colagenoliza.* Colagenul izolat din diverse ţesuturi se reînnoieşte în perioade variabile de timp, în funcţie de organul căruia aparţine. Astfel, studiile cu izotopi radioactivi făcute pe şobolani au dovedit că timpul de înjumătăţire a colagenului din piele este de 200 zile, din muşchi de 60 zile şi din ficat de 30 zile. Se cunosc şi situaţii în care colagenul se degradează şi se reînnoieşte mult mai repede; spre exemplu, în involuţia uterului după naştere (post partum), în vindecarea rănilor etc. Indiferent de ritmul de reînnoire, în procesele fiziologice normale, există un echilibru foarte bine păstrat între biosinteza colagenului şi degradarea lui. Această degradare se numeşte colagenoliză şi are loc sub acţiunea unor enzime hidrolitice numite colagenaze.

Colagenazele sînt secretate de către celulele ţesutului conjunctiv sub formă inactivă de procolagenaze. În mediul extracelular ele sînt activate şi îşi exercită acţiunea hidrolitică.

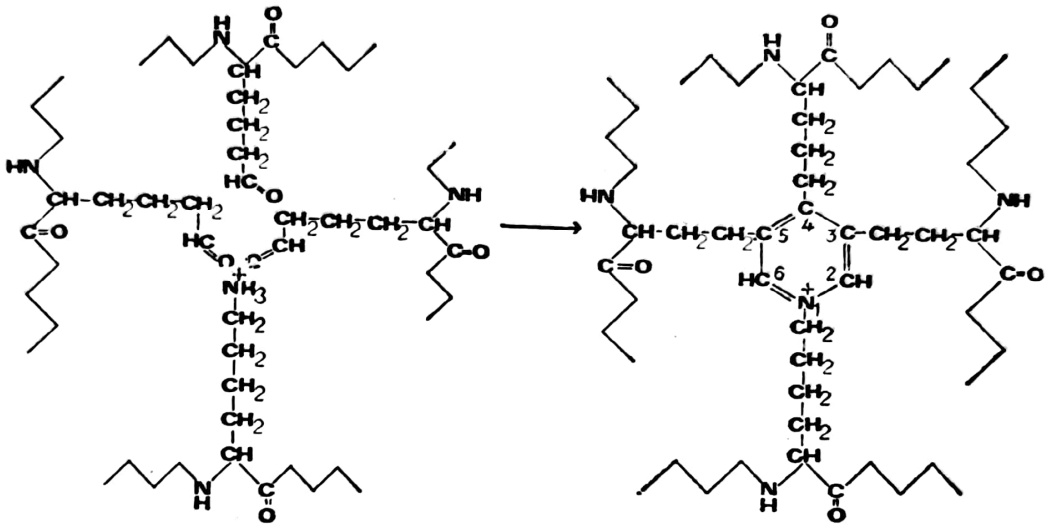
În urma intervenţiei colagenazelor din colagen rezultă peptide cuprinzînd hidroxiprolina sau chiar hidroxiprolina liberă. Hidroxiprolina nu poate fi reutilizată pentru biosinteza de colagen şi de aceea este luată de sînge (devenind un component al plasmei) şi dusă la ficat unde este degradată. O parte din hidroxiprolina plasmatică se elimină prin urină.

Pentru motivul că toate procesele degradative ale colagenului au loc cu intervenţia colagenazelor iar în urma acţiunii lor se eliberează hidroxiprolină, dozarea acestui aminoacid în plasmă şi în urină are rol de diagnostic. Într-adevăr, nivelul crescut al hidroxiprolinei libere plasmatice sau a celei urinare este adesea un indicator preţios pentru aprecierea diverselor stări patologice însoţite de colagenolize (hiperparatiroidism primar, unele boli osoase).

1.2.1.2. *Elastina.* Aceasta este cea mai importantă proteină din ţesutul conjunctiv al fibrelor elastice. În cea mai mare cantitate ea se află în ţesutul conjunctiv al aortei, de unde — de altfel — se şi izolează mai uşor.

Scanned with OKEN Scanner

Ca și colagenul, elastina este sintetizată în fibroblaste. De fapt, rezultatul biosintezei este proelastina care cuprinde majoritatea aminoacizilor caracteristici (vezi Cap. III) și care devine elastina propriu-zisă numai după secreția în mediul extracelular. În acest mediu ea se unește cu colagenul și alți constituenți ai țesutului conjunctiv. Elastina formează și agregate de cîte două



Desmozina.

molecule care se unesc covalent datorită resturilor de lizină constitutive. La aceste legături covalente participă o moleculă de lizină ca atare, ce se condensează la guprarea NH_2 liberă cu gruparea carbonil dintr-un rest de lizină dezaminată oxidativ la stadiul de lizil-aldehidă. Acest proces este cu totul asemănător celui care are loc cînd se stabilesc legăturile intra- și intercatenare din microfibrilele de colagen. Însă, de cele mai multe ori, în elastină se stabilesc legături covalente prin participarea la condensări a 3 radicali de lizil-adehidă (aparținînd fiecare cîte unei catene polipeptidice) și un radical lizil, ca atare, dintr-o a patra catenă polipeptidică. Compusul rezultat din această condensare se numește desmozina, iar cel care cuprinde ligantul din poziția 4 în poziția 2 se numește izodesmozina. Datorită structurii acestor doi compuși se stabilesc veritabile punți între catenele polipeptidice ale elastinei, asigurîndu-se totodată și posibilitatea de alungire sau scurtare în direcții diferite (elasticitatea).

Ca și în cazul colagenului, elastina este degradată prin hidroliză enzimatică. Hidrolaza corespunzătoare se numește elastază.

1.2.2. GLUCIDELE

1.2.2.1. *Proteoglicanii.* Se numesc proteoglicani combinațiile în care predomină din punct de vedere cantitativ componenta polizaharidică numită și glican, față de componenta proteică. Dintre aceștia, cei mai importanți sînt *proteoglicozaminoglicanii* în care componenta zaharidică este constituită din glicozaminoglicani (mucopolizaharide, după nomenclatura veche). Cei mai reprezentativi glicozaminoglicani sînt: condroitin-4-sulfatul, condroitin-6-sulfatul, dermatan-sulfatul și cherato-sulfatul. Structura lor chimică a fost dată anterior (în cap. IX), privind glucidele. Deși în grupul glicozaminoglicanilor intră și acidul hialuronic, el se deosebește de ceilalți deoarece nu se află legat

Scanned with OKEN Scanner

cu proteinele în ţesutul conjunctiv din diverse organe, ci numai sub formă liberă.

a) *Structura şi biosinteza proteoglicozaminoglicanilor.* Proteoglicozaminoglicanii cuprind 80—94% glicozaminoglicani şi 6—20% proteine. Este de remarcat faptul că glicozaminoglicanii pot fi şi „amestecaţi" într-o moleculă

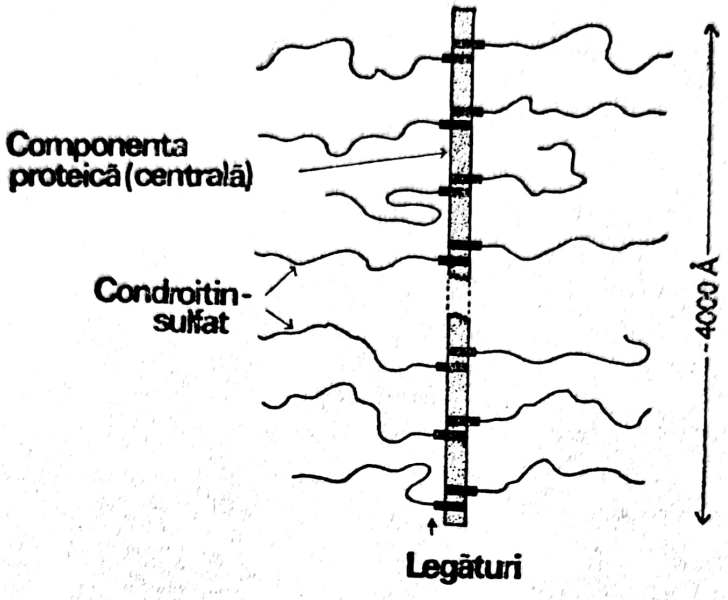


Fig. XV.6. Schema unui proteoglicozaminoglican polianionic.

de proteoglican, în sensul că alături de aminozaharuri cuprind şi resturi de monozaharide diverse sau numai resturi de diferite monozaharide. Spre exemplu, un trizaharid format din două molecule de galactoză şi o moleculă de xiloză poate constitui o catenă care se leagă glicozidic la grupările OH dintr-un rest de serină sau de treonină din catenele polipeptidice ale componentei proteice. Numărul catenelor laterale de natură glicanică fixate pe componenta proteică variază între 2 şi 60, în funcţie de numărul resturilor de hidroxiaminoacizi din lanţurile polipeptidice. În figura XV.6 este reprezentată schema unui proteoglicozaminoglican.

Biosinteza proteoglicanilor are loc tot în fibroblaşti ca şi a proteinelor ţesutului conjunctiv.

La biosinteza proteoglicozaminoglicanilor participă trei categorii de compuşi: aminoacizi, D-glucoză şi radicali sulfurici.

Aminoacizii servesc, în primul rînd, la constituirea lanţurilor polipeptidice din componenta proteică. Pe de altă parte, în urma dezaminării, ei sînt donatori de grupe $-NH_2$ necesare biosintezei de aminozaharuri (glicozamine). D-glucoza reprezintă zaharul de plecare pentru biosinteza monozaharidelor sau a derivaţilor de monozaharide din componenta glucidică. Radicalii de acid sulfuric participă la constituirea grupărilor sulfurice din glucozaminoglicani, sub formă de sulfat activat. Activarea se face pe seama ATP-ului sub acţiunea ATP-sulfurilazei şi APS (adenozinmonofosfosulfat)-kinazei. Faptul că ATP-sulfurilaza îşi intensifică activitatea în prezenţa retinolului, explică rolul favorizant al vitaminei A în anabolismul ţesutului conjunctiv (prin promovarea biosintezei proteoglicanilor constitutivi).

După încheierea biosintezei componentei proteice sau — de cele mai multe ori — chiar în cursul formării catenelor polipeptidice pe ribozomi, la nivelul grupărilor —OH din treonină sau serină se leagă treptat resturile glucidice şi la acestea din urmă, radicalii sulfurici. Enzimele participante sînt respectiv, glicoziltransferaze specifice fiecărui rest de glucid şi o sulfat-transferază.

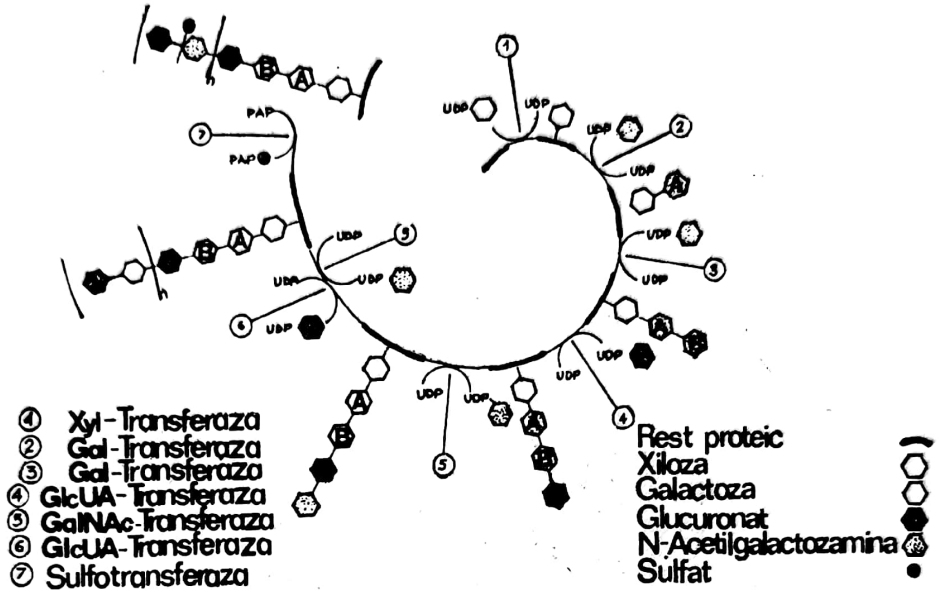


Fig. XV.7. Biosinteza catenei condroitin-4-(6)-sulfatului.

În figura XV. 7 este schematizată biosinteza unui proteoglicozaminoglican în care componenta glucidică este constituită din condroitin-4-sulfat.

Biosinteza proteoglicanilor se află sub direct reglaj hormonal. În special insulina şi glucocorticoizii intervin în biosinteza componentelor glucidice ale diverşilor proteoglicani. Astfel, insulina favorizează biosinteza acidului hialuronic şi a condroitin-sulfaţilor. Acest fapt explică de ce la diabetici este mai mare pericolul infectării cu bacterii a ţesutului conjunctiv din tegumente sau diverse alte organe. Cortizonul şi cortizolul inhibă biosinteza glicozaminoglicanilor, ceea ce explică acţiunea defavorizantă a acestor hormoni în procesul vindecării rănilor.

b) *Degradarea proteoglicozaminoglicanilor* are loc prin intermediul unor hidrolaze de origine lizozomală şi este prezentată în schema următoare (fig. XV. 8).

Asemănător situaţiei întîlnite la colagen, şi în cazul proteoglicanilor din constituţia ţesutului conjunctiv există un echilibru dinamic permanent între biosinteză şi degradare. Tulburarea acestui echilibru conduce la diverse stări patologice, prezentate la sfîrşitul acestui capitol.

Structura macromoleculară a proteoglicanilor, cu constituţia descrisă anterior, favorizează — în primul rînd — legarea multor molecule de apă. Pe de altă parte, proteoglicanii fixează cationii (Na^+, K^+, Ca^{2+}) datorită faptului că au mulţi radicali acizi şi deci sînt macromolecule polianionice. În sfîrşit, macromoleculele proteoglicanilor se asociază cu fibrilele de colagen (fig. XV. 9). Formaţiunile astfel create în ţesutul conjunctiv constituie o barieră pentru trecerea substanţelor cu molecule mai mari şi reglează transportul substanţelor cu molecule mai mici, îndeplinind rolul unor veritabile site moleculare.

Scanned with OKEN Scanner

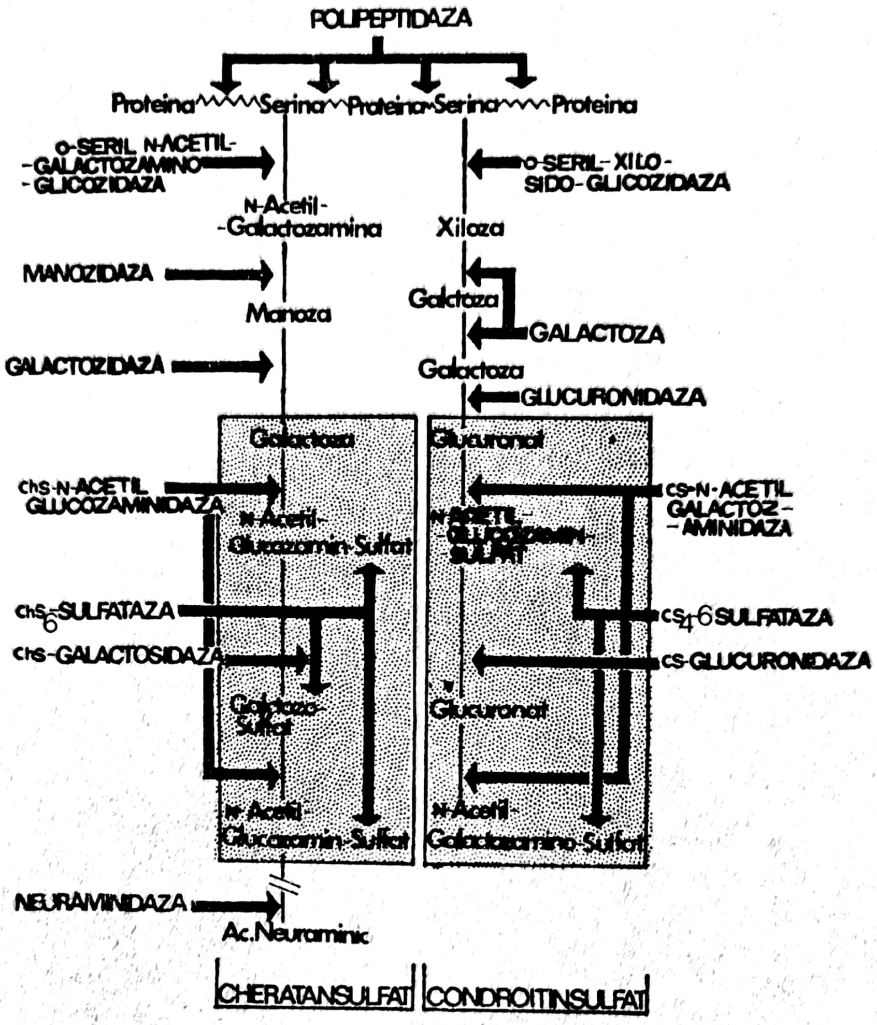


Fig. XV,8. Degradarea proteoglicozaminoglicanilor.

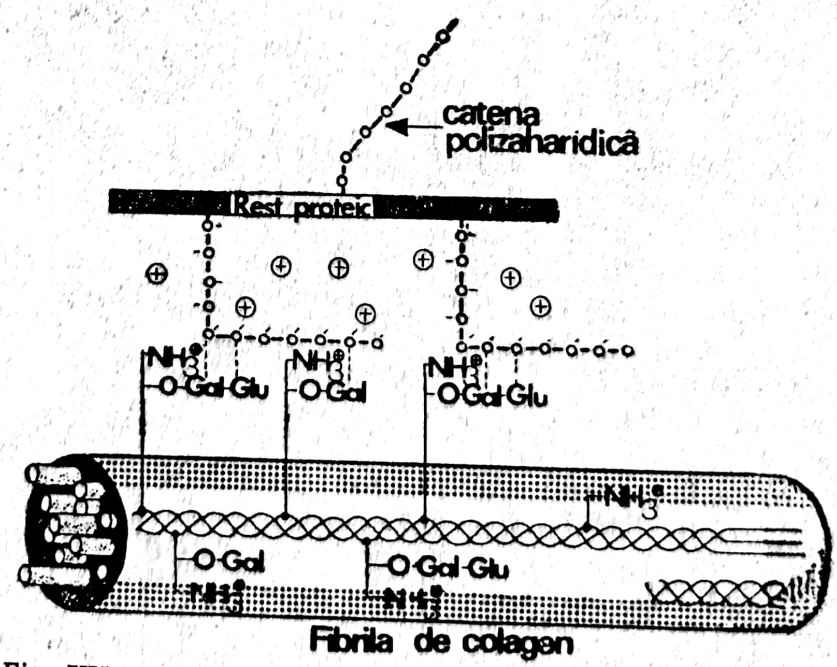


Fig. XV.9. Acțiunea de schimb ionic a colagenului și a proteoglicanilor din cartilaje.

Scanned with OKEN Scanner

1.2.2.2. *Glicoproteinele.* Glicoproteinele sînt constituite şi ele dintr-o componentă proteică şi una glucidică dar predomină cantitativ cea de natură proteică. Componenta glucidică este constituită, la rîndul ei, din numeroase şi variate zaharuri: hexoze (unite adesea cîte 7 într-o aceeaşi catenă), aminozaharuri (N-acetil-D-glucozamină şi N-acetil-D-galactozamină), pentoze (D-xiloză, L-arabinoză) şi metilpentoze (L-fucoză). Catenele constituite din monozaharidele neutre: D-manoză, D-galactoză, L-fucoză, D-xiloză, L-arabinoză şi D-glucoză se fixează fie prin legătură (N- β-aspartil)-glicozaminică la un rest de acid aspartic, fie prin legătură O-seril-glicozidică la un rest de serină din lanţurile polipeptidice ale componentelor proteice.

Este de remarcat faptul că, spre deosebire de glicoproteinele funcţionale solubile (enzime, mucine, hormoni, glicoproteine serice), cele din ţesutul conjunctiv sînt glicoproteine structurale. Deşi funcţiile glicoproteinelor nu sînt încă bine cunoscute, se crede că cele din ţesutul conjunctiv ar participa la procesul calcificării (vezi mai departe la ţesutul osos) şi ca factori reglatori în însăşi morfogeneza ţesutului din care fac parte.

Ţinînd seama de toţi constituenţii principali ai ţesutului conjunctiv, descrişi aici, de proprietăţile şi structurile lor precum şi de modalităţile în care se pot asocia unii cu alţii, se înţelege că — împreună — ei contribuie la constituirea unui complex care răspunde tuturor funcţiilor împlinite de ţesutul conjunctiv. Această unitate funcţională complexă este prezentată în schema din fig. XV.10. Din figură rezultă că modificarea oricărui proces biochimic ilustrat în schemă, poate avea drept consecinţe modificarea constituenţilor şi funcţionarea anormală a întregului complex, atrăgînd instalarea unor boli ale ţesutului conjunctiv. Acestea sînt menţionate în subcapitolul următor.

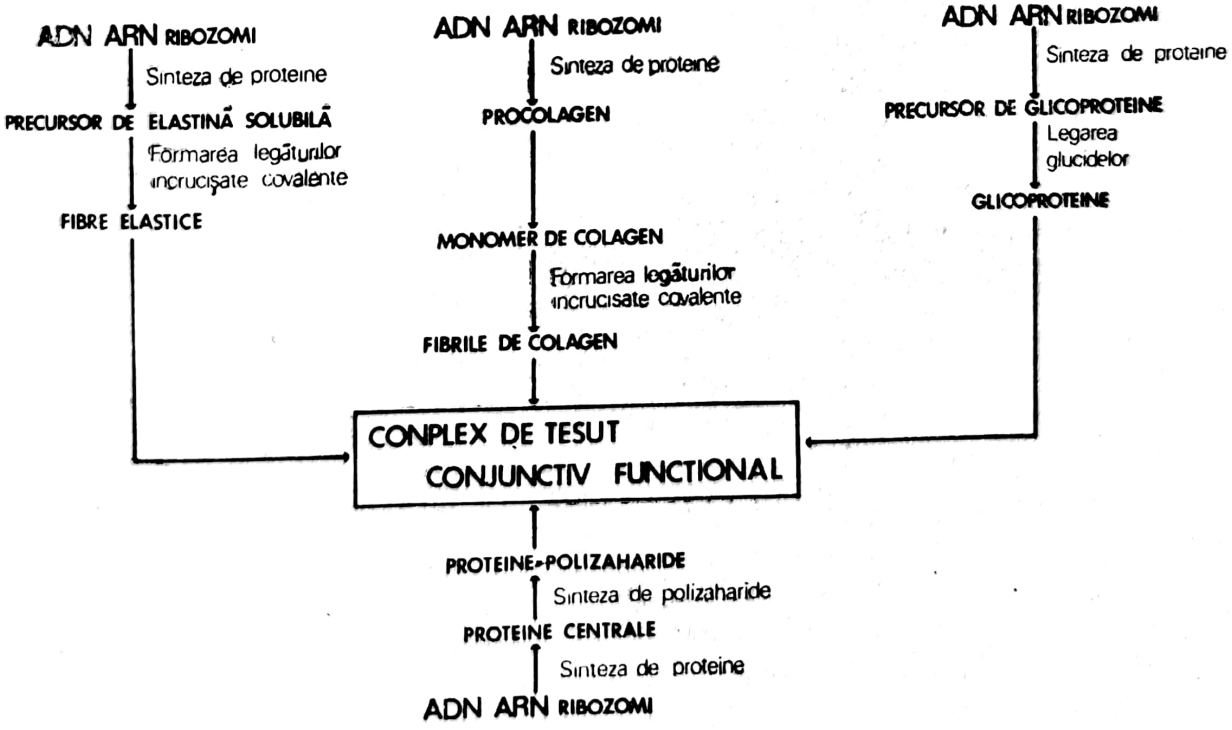


Fig. XV.10. Contribuţia diverselor macromolecule constituente la formarea complexului funcţional din ţesutul conjunctiv. (Pentru fiecare macromoleculă este prezentată şi schema parţială a biosintezei respective.)

Scanned with OKEN Scanner

1.2.3. MODIFICĂRILE CONSTITUENȚILOR ȚESUTULUI CONJUNCTIV

Constituenții țesutului conjunctiv pot suferi două genuri de modificări: fiziologice și patologice. Modificările fiziologice sînt asociate în special, cu înaintarea în vîrstă; cele patologice se datoresc, de cele mai multe ori, funcționării anormale a unor enzime care participă la anabolismul sau catabolismul constituenților țesutului conjunctiv. Uneori sînt implicați însă și factori genetici în determinarea bolilor acestui țesut.

În cele ce urmează se menționează cîteva modificări cantitative și calitative ale unora din constituenții țesutului conjunctiv.

1.2.3.1. *Modificări în funcție de vîrstă.* Odată cu înaintarea în vîrstă au loc modificări importante din punct de vedere cantitativ la nivelul țesutului conjunctiv. Într-adevăr, concentrația colagenului crește cu vîrsta (în special, la nivelul pielii, aortei, diverselor cartilaje), în timp ce scad concentrațiile mucopolizaharidelor și a apei. Acest ultim fapt are ca rezultat schimbarea proprietăților fizice ale macromoleculelor din țesutul conjunctiv, inclusiv ale colagenului care manifestă tendința de a cristaliza în interiorul fibrelor. În ceea ce privește scăderea concentrației mucopolizaharidelor, este de remarcat că ea se face preferențial pentru anumiți glicozaminoglicani și în anumite organe. Spre exemplu, în cartilaje scade — mai cu seamă — concentrația condroitin-6-sulfatului, se reduce în mai mică măsură concentrația condroitin-4-sulfatului iar concentrația cheratan-sulfatului rămîne neschimbată sau chiar crește. Deoarece catenele polizaharidice de condroitin-sulfați și cheratan-sulfat sînt atașate la aceeași catenă polipeptidică centrală, se consideră că odată cu înaintarea în vîrstă au loc modificări ale biosintezei proteoglicanilor numai în unele regiuni dintr-un același complex funcțional. Aceste modificări parțiale au consecințe importante pentru gradul de hidratare al cartilajului, precum și pentru posibilitatea eventualei sale calcificări (vezi mai departe la țesutul osos).

1.2.3.2. *Colagenozele.* Colagenozele sînt boli ale țesutului conjunctiv în care au loc modificări cantitative și calitative ale colagenului. În categoria acestor boli se încadrează artrita reumatismală, osteoartrita, lupusul eritematos, precum și unele boli ereditare.

În cele ce urmează se specifică defectele metabolice dovedite în unele din aceste colagenoze.

— În *artrita reumatismală* s-a constatat o activitate anormal de mare a enzimelor proteolitice lizozomale. Datorită acestui fapt, proteinele (în special colagenul) țesutului conjunctiv sînt degradate hidrolitic. Ca urmare, se reduce foarte mult numărul fibrelor de colagen din țesutul respectiv și, în locul lor, apar infiltrate inflamatorii. Trebuie remarcat însă că în artrita reumatismală și macromoleculele de acid hialuronic din lichidul sinovial sînt parțial degradate.

— În *colagenoza genetică prin deficit de hidroxilizină* activitatea lizilhidroxilazei este puternic inhibată sau nu se manifestă deloc. Datorită lipsei de activitate a acestei enzime care catalizează hidrolizarea lizinei, numărul resturilor de hidroxilizină din colagen este foarte redus sau chiar nul, ceea ce atrage — bineînțeles — modificări în însăși structura primară a colagenului, determinînd modificarea proprietăților lui. Astfel, colagenul are tendința

Scanned with OKEN Scanner

Tabelul XV.2

Diverse manifestări ale unor mucopolizaharidoze

Sindromul	Manifestări clinice						Mucopolizaharidul predominant în urină
	Modificări somatice și scheletice	Întîrziere mintală	Cardio-pulmonar	Hepatosplenomegalie	Opacifierea corneei	Pierderea auzului	
Hurler	marcate	severă după primul an	slăbirea ventilației	marcată	progresivă	prezentă	Dermatansulfat Heparinsulfat
Hunter	moderate pînă la marcate	severă dar gradată	hipertensiune pulmonară	marcată	rară	prezentă	Dermatansulfat Heparinsulfat
Sanfilippo	slabe	severă	nedescrise	moderată	absentă	prezentă	Heparinsulfat
Morquio	marcată	absentă	îngustarea aortei	ușoară	prezentă dar întîrziată	prezentă dar nu severă	Cheratosulfat
Scheie	slabe	absentă	afecțiune aorticovalvulară	variabilă	marcată	variabilă	Dermatansulfat
Maroteaux Lamy	marcate	absentă	murmur cardiac	moderată	prezentă	variabilă	Dermatansulfat

Scanned with OKEN Scanner

să se solubilizeze iar țesuturile în constituția cărora intră sînt lipsite de rigiditatea necesară: pielea și articulațiile devin mult prea flexibile iar coloana vertebrală se curbează. Colagenozele determinate genetic nu se datoresc totdeauna numai lipsei unei enzime implicată în metabolismul colagenului. Spre exemplu, maladia numită „Osteogenesis imperfecta" care se caracterizează prin dezorganizarea totală a țesutului conjunctiv din tendoane, ligamente, aparat digestiv, sistem osos (schelet), scleră, are drept cauză biosintetizarea de către fibroblaști a unui colagen fetal (cuprinzînd 3 catene polipeptidice identice de tip α_1) în locul colagenului normal (constituit dintr-o catenă de tip α_2 și două de tip α_1). Această singură diferență are multiple repercusiuni defavorabile manifestate la nivelul organelor menționate: sclera este albastră, auzul este scăzut, oasele se deformează și se fracturează ușor etc.

1.2.3.3. *Mucopolizaharidozele.* Mucopolizaharidozele sînt o categorie de boli genetice care se caracterizează prin depozitarea de mucopolizaharide în țesuturi și printr-o excesivă excreție urinară. În aceste maladii au loc modificări la nivelul scheletului, dezvoltarea organelor este întîrziată, acuitatea auditivă este pierdută, se instalează — mai repede sau mai încet — întîrzierea mintală, se produc tulburări cardio-pulmonare de diverse tipuri și intensități, hepatosplenomegalie etc.

Mucopolizaharidozele sînt suficient de frecvente. Ele au fost studiate de mulți cercetători și sînt cunoscute azi sub numele de sindroame ale acestora. În tabelul XV.2 sînt menționate unele tipuri deosebite de mucopolizaharidoze, indicîndu-se, pentru fiecare în parte, manifestările clinice caracteristice și mucopolizaharidele predominante, eliminate prin urină. Faptul că mucopolizaharidele se află în cantități foarte mari în țesuturi, dovedește că în cazul mucopolizaharidozelor biosinteza acestor compuși este mult intensificată. Pe de altă parte, excreția excesivă de mucopolizaharide prin urină indică o degradare defectuoasă a lor. Prin urmare, modificările metabolice caracteristice mucopolizaharidozelor privesc atît anabolismul, cît și catabolismul mucopolizaharidelor din țesutul conjunctiv.

2. ȚESUTUL OSOS

Țesutul osos este un țesut de susținere mult diferențiat și caracterizat prin două însușiri fundamentale: (a) rezistență mecanică mare și (b) elasticitate apreciabilă. Rezistența mecanică îi este conferită de substanțele minerale pe care le cuprinde iar elasticitatea este datorită constituenților săi organici.

2.1. COMPOZIȚIA ȚESUTULUI OSOS

Compoziția chimică globală a osului brut este — în medie — de: 40% apă, 16% lipide, 12% proteine și 23% săruri minerale.

Din punct de vedere structural, oasele sînt formate din fibre de colagen dispersate într-o substanță fundamentală și din săruri minerale. În țesutul rezultat din asocierea acestor componente structurale se creează și lacune în care sînt plasate celulele osoase (osteoblastele, osteocitele, osteoclastele etc.)

Scanned with OKEN Scanner

2.1.1. CONSTITUENȚII MINERALI

Acești constituenți reprezintă așa numitele „săruri ale osului." Compoziția lor este prezentată în tabelul XV.3.

Tabelul XV.3

Compoziția chimică a substanțelor minerale intrînd în constituția osului

Constituentul	% din greutatea osului degresat și uscat la 100°
Cenușă	70,2
Azot	4,43
Anioni	
Acid fosforic (exprimat în P)	12,6
Acid carbonic (exprimat în CO_2)	3,90
Acid citric	1,20
Acid lactic	0,12
Cationi	
Sodiu	3,43
Calciu	27,5
Magneziu	0,43
Raport Ca/P	2,18
Raport P/N	3,67

Ținînd seama de constituenții care figurează în tabelul XV.3, este de remarcat că mai mult de 95% din substanțele minerale sînt reprezentate de: calciu, ortofosfați și carbonați. Combinațiile rezultate în cea mai mare măsură sînt: fosfatul tricalcic (după cum rezultă din raportul Ca/P, apropiat de 1,94) și carbonatul de calciu. Cu ajutorul spectrelor de difracție a razelor X s-a constatat că aceste două combinații sînt asociate în apatite microcristaline complexe de tipul:

$$[Ca(Ca_3(PO_4)_2)_3]^{2+}\ 2\ X^-$$

în care X reprezintă diverși anioni (CO_3^{2-}, HO^-, F^-).

Rețelele cristaline ale acestor combinații complexe au puncte de nesaturare în care adesea sînt fixați — prin chimosorbție — și alți ioni (Na, Pb, Ra, U, Sr). Pe lîngă principalul constituent mineral menționat, osul mai cuprinde: carbonat de calciu, fosfați de magneziu, precum și săruri organice insolubile de calciu; în special, lactat și citrat de calciu.

Substanța minerală a osului se modifică în tot cursul vieții. Această modificare este netă în timpul creșterii, cînd are loc o continuă osificare a cartilajelor și este mai discretă după încetarea creșterii, cînd osul se îmbogățește în carbonați de calciu, așa cum rezultă din creșterea continuă a raportului Ca/P.

Reînnoirea constituenților minerali din oasele adultului a fost pusă în evidență cu ajutorul izotopului radioactiv al fosforului P^{32}. S-a constatat astfel că dacă un animal adult ingerează fosfați marcați cu acest izotop, oasele animalului fixează — în decurs de o săptămînă — cca 30% din P^{32}. Apoi, încetul cu încetul, fosforul radioactiv își scade concentrația din oasele

Scanned with OKEN Scanner

în care s-a integrat — prin schimb cu izotopul natural al fosforului, P^{31} — şi se fixează în dentina dinţilor. Această înlocuire are loc printr-un veritabil schimb fizico-chimic.

2.1.2. CONSTITUENŢII ORGANICI

Substanţele organice din constituţia osului, în proporţie de 30%, alcătuiesc matricea lui. 95% din matricea osului este reprezentată de colagen. Acesta se află — ca şi în ţesutul conjunctiv — sub formă de fibre rezultate prin agregarea de fibrile cu structură periodică.

Fibrele de colagen din os sînt fixate pe o substanţă fundamentală, alcătuită din două componente organice principale: oseina şi osteomucoidul.

Oseina este o scleroproteină, insolubilă în apă, acizi şi baze, care prin fierbere în apă, se transformă în gelatină. Din punct de vedere chimic, oseina cuprinde mult glicocol şi hidroxiprolină dar este săracă în tirozină, triptofan şi aminoacizi cu sulf.

Osteomucoidul este un complex mucoproteic rezultat din combinarea unui acid condroitinsulfuric cu o proteină. Acest osteomucoid este foarte asemănător cu condromucoidul aflat în cartilaje şi din care provine.

În substanţa fundamentală a osului se mai găsesc gliceride, fosfolipide şi glicogen.

Este de remarcat faptul că principalii constituenţi ai substanţei fundamentale, oseina şi osteomucoidul, sînt uniţi prin legături ionice şi totodată sînt combinaţi cu fibrele de colagen. De asemenea, aceste componente organice „ancorează" cristalele osoase constituite din substanţa minerală. Întreg edificiul astfel format (fig. XV.11) devine foarte solid. Constituenţii organici ai osului se află şi ei într-o continuă reînnoire, însă reînnoirea colagenului se face mult mai încet. Indiferent de ritmul rapid sau lent al reînnoirii, aceasta este asigurată permanent în os prin furnizarea de energie în urma degradării glucozei provenită, la rîndul ei, din degradarea glicogenului. La nivelul osului, glucoza este degradată pe calea Embden-Meyerhof, urmată de ciclul acizilor tricarboxilici.

2.2. CELULELE OSOASE

După cum s-a menţionat, osul cuprinde două tipuri principale de celule: (1) osteoblastele, care predomină în zonele de creştere şi (2) osteoclastele care predomină în regiunile de resorbţie.

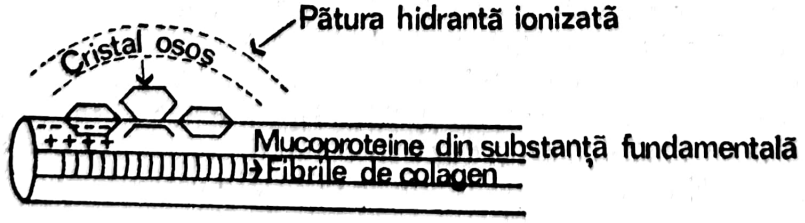


Fig. XV.11. Fixarea substanţei minerale pe matricea organică a osului.

Osteoblastele sînt celule mononucleate care au rol important în formarea osului. Ele dau naştere la mucopolizaharidele din substanţa fundamentală şi la protocolagenul solubil. Faptul că în osteoblaste există colagen şi enzimele

Scanned with OKEN Scanner

de degradare ale acestuia, explică rolul lor în procurarea energiei. De asemenea, osteoblastele mai cuprind o fosfatază alcalină, precum şi acid ribonucleic, participant la sinteza proteinelor din substanţa fundamentală.

Osteoblastele sînt celule polinucleate cu rol important în depolimerizarea substanţei fundamentale. Ele au, în special, activitate proteolitică intensă, hidrolizînd principalele proteine din substanţa fundamentală. Osteoclastele nu conţin fosfataze.

Funcţiile opuse ale acestor două tipuri de celule osoase (osteoblaste şi osteoclaste) explică deplin faptul că osul se află într-o permanentă reînnoire.

2.3. BIOCHIMIA PROCESULUI DE FORMARE ŞI DISLOCARE A OSULUI

2.3.1. FORMAREA OSULUI

Aceasta presupune: (1) formarea substanţei fundamentale, (2) formarea fibrelor de colagen şi (3) mineralizarea. În realizarea lor rolurile hotărîtoare le împlinesc osteoblastele. Într-adevăr, aşa cum s-a mai menţionat, ele formează mucopolizaharidele şi fibrele de colagen. De asemenea, osteoblastele promovează şi mineralizarea, aşa cum se arată în cele ce urmează.

Mineralizarea osului presupune, la rîndul ei, desfăşurarea simultană a trei procese: (a) creşterea concentraţiei ionilor fosforici bivalenţi (HPO_4^{2-}); creşterea concentraţiei ionilor Ca^{2+} şi (c) creşterea pH-ului (deci realizarea unui pH bazic).

Creşterea concentraţiei ionilor HPO_4^{2-} se explică luîndu-se în considerare pe de o parte, sursele care furnizează radicali fosforici iar pe de altă parte, enzimele care înlesnesc dislocarea acestor radicali din substrate. O primă sursă de ioni fosforici o reprezintă ionii HPO_4^{2-} plasmatici. O a doua sursă o formează diverşii esteri fosforici (tot din plasmă). Sub acţiunea fosfatazelor, din aceşti esteri se liberează radicali fosforici. Ionii fosforici din plasmă participă la dislocarea fosforolitică a glicogenului din osteoblaste conducînd la formarea de glucoză-1-P. Procesul are loc sub acţiunea fosforilazelor. Ulterior — sub acţiunea fosfatazei alcaline din osteoblaste — se eliberează, prin hidroliza glucozei-1-P anionii fosforici HPO_4^{2-}.

Creşterea concentraţiei ionilor Ca^{2+} are loc prin fixarea acestora pe condroitin-sulfaţii din constituţia mucopolizaharidelor substanţei fundamentale. Condroitin-sulfaţii fixează ionii Ca^{2+} la nivelul grupelor sulfurice acide (resturile $-SO_3H$).

Creşterea pH-ului ar putea fi atribuită influenţei exercitată de hormonii steroizi care inhibă glicoliza propriu-zisă, deci formarea de acid lactic (care ar acidifica mediul).

Pentru mineralizarea osului, ionii HPO_4^{2-} şi Ca^{2+} sînt fixaţi imediat după mobilizarea lor, independent unii de alţii, pe matricea osului. Ulterior ei sînt eliberaţi simultan de pe matrice formîndu-se $HCaPO_4$. Deoarece mediul este alcalin, fosfatul monoacid de calciu trece în fosfat neutru tricalcic, $Ca_3(PO_4)_2$, iar acesta formează — prin înglobare de alţi ioni, aşa cum s-a menţionat — cristalitele complexe de hidroxilapatită.

2.3.2. DISLOCAREA OSULUI

Aceasta este determinată de osteoclaste dar mecanismul ei nu este încă perfect elucidat. Se pare că osteoclastele determină o solubilizare a substanţei

Scanned with OKEN Scanner

minerale, prin acidifierea mediului, în urma formării de acid lactic (în glicoliză) şi acid citric (în ciclul Krebs).

În fig. XV.12 sînt prezentate schematic schimburile ionice care au loc în cursul formării şi dislocării osului.

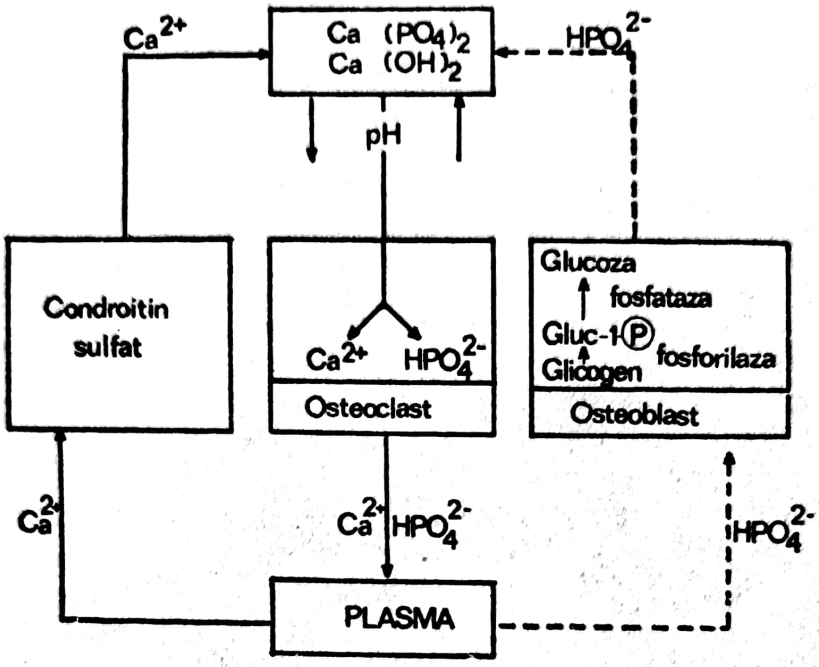


Fig. XV.12. Metabolismul mineral la nivelul osului.

2.3.3. REGLAREA HORMONALĂ A FORMĂRII ŞI DISLOCĂRII OSULUI

Parathormonul are acţiune osteolitică exercitată atît asupra substanţei minerale, cît şi asupra celei organice. Într-adevăr, pe de o parte, el intensifică metabolismul glucidic din osteoblaste, favorizînd formarea de acid lactic (prin glicoliză) şi de acid citric (prin ciclul Krebs), ceea ce antrenează solubilitatea substanţei minerale iar pe de altă parte, parathormonul promovează depolimerizarea mucopolizaharidelor şi mucoproteinelor din substanţa fundamentală.

Tiroxina favorizează osificarea oaselor lungi la nivelul epifizelor.

Tireocalcitonina intensifică procesul de fixare a calciului la nivelul osului, contracarînd dislocarea osului stimulată de parathormon.

Somatotropina sau hormonul de creştere favorizează osificarea — mai ales la nivelul subperiostal — şi promovează biosinteza colagenului precum şi a mucopolizaharidelor din substanţa fundamentală.

Insulina, ca şi somatotropina, favorizează sinteza colagenului şi a mucopolizaharidelor acide din substanţa fundamentală.

Esterogenii intervin favorabil în formarea oaselor lungi, în general. S-a constatat totuşi — în ultimul timp — că răspunsul prin creşterea oaselor la administrare de estrogeni variază, atît cu specia animală, cît şi cu modul de administrare al hormonului.

Scanned with OKEN Scanner

BIOCHIMIA ŢESUTULUI HEPATIC

GENERALITĂŢI

Ficatul este un organ cu poziţie importantă şi rol metabolic multiplu, atît în condiţii normale cît şi în situaţii patologice. Din acest motiv Ludwig l-a numit „laboratorul central al organismului". În acest organ se desfăşoară, atît procesele energetice şi sintezele necesare vieţii celulare proprii, cît şi sinteza de degradare a multora dintre componentele structurale şi funcţionale ale celorlalte ţesuturi şi organe (fig. XVI.1). Poziţia sa anatomic-funcţională are două caracteristici şi anume:

— reprezintă *staţiunea intermediară* dintre vena portă şi circulaţia generală;

— alcătuieşte un *sistem* de strînsă *interdependenţă cu plasma.*

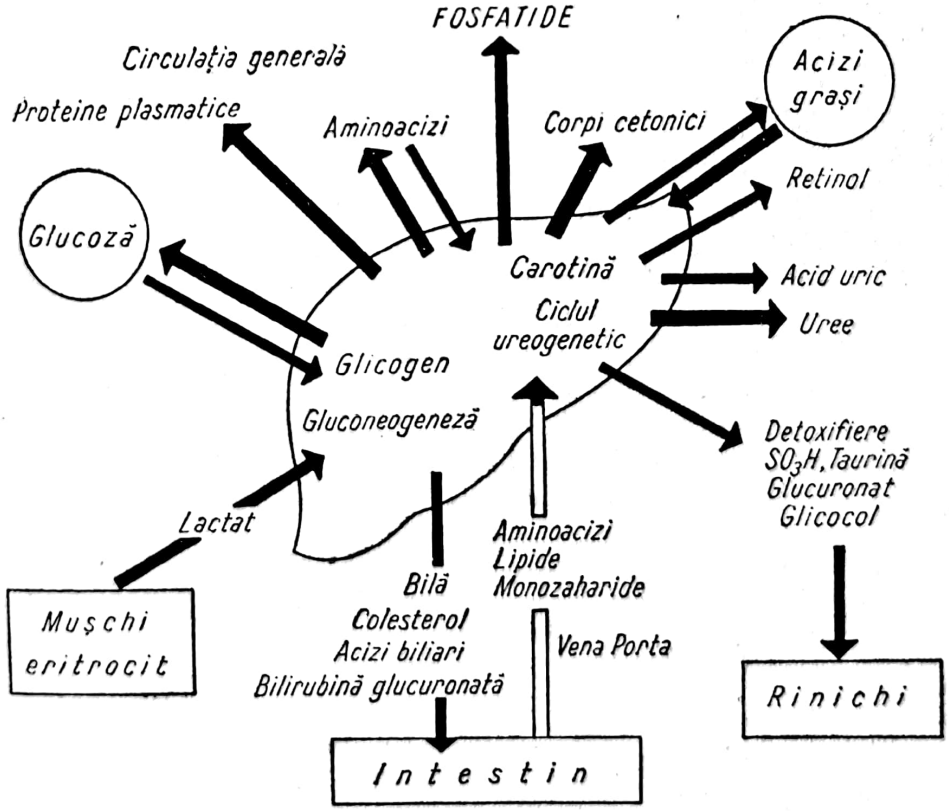


Fig. XVI.1. Rolul central al ficatului în metabolismul intermediar.

Scanned with OKEN Scanner

Toate substanţele resorbite din intestin, pe cale circulatorie, trebuie să treacă prin ficat. Aprovizionarea cu substanţele nutritive fiind discontinuă, concentraţiile substanţelor — ca de exemplu glucoza şi aminoacizii — din vena portă sînt supuse unui regim de „flux şi reflux". Dimpotrivă, în circulaţia generală concentraţia substanţelor este în regim „homeostatic". Ficatul intervine activ în reglementarea echilibrului dintre cele două regimuri de concentraţie, cel oscilant al venei porte şi cel cvasiconstant al circulaţiei generale.

Tabelul XVI.1

Compoziţia chimică a ficatului

Componenţi	Conţinut procentual
Apă	70—75
Proteine	12—24
Lipide	2—6 patologic 20
Glicogen	2—8 patologic 20 (glicogenoze)
Fier	0,02 patologic 0,2 (hemocromatoze)

În interiorul ficatului circulaţia arterială şi cea venoasă portală se anastomozează. Un sistem de capilare şi sinusoide (căi circulatorii deschise) conduc sîngele pentru alimentarea fiecărei celule şi se varsă în vena centro-lobulară.

Ţesutul hepatic este alcătuit 80% din celule parenchimatoase, 16% din celulele sistemului reticulo-endotelial (celule Kupffer), 4% din alte elemente celulare.

Compoziţia chimică a ficatului este redată în tabelul XVI.1.

Aproximativ 70% din sîngele care trece prin ficat, este adus prin vena portă şi 30% prin artera hepatică. Ficatul primeşte din sînge 1/4 pînă la 1/3 din minut volumul cardiac, cca 1,5 l/minut (din care 1 litru/minut prin vena portă). Sîngele arterio-venos trece prin ficat cu ritmul de 1 ml/minut/gram ţesut hepatic. Substanţele cu greutate moleculară mare sînt preluate de către celulele din sinusoide, prin pinocitoză, iar cele cu greutate moleculară mică, prin difuziune sau mecanisme speciale de transport. După metabolizare, produsele sînt evacuate prin capilarele biliare sau sînt trecute în sistemul venos. Ficatul participă cu 1/7 la producţia de energie a organismului, în condiţii bazale. Rezerva biologică a ficatului este imensă. Ea se manifestă prin două posibilităţi reactive, care-l deosebesc de alte organe. (1) Are o *rezervă funcţională* ce se păstrează chiar cînd numai 15% din parenchim este metabolic indemn. Graniţa rezervei vitale a ficatului merge chiar pînă la 7% din parenchimul total, ceea ce înseamnă că numai după distrugerea a 93% din parenchim, situaţia devine incompatibilă cu viaţa. (2) Ficatul are o mare *capacitate de regenerare*. Experimental s-au realizat într-un an 12 hepatectomii subtotale (la şobolani), fără a se creea deficit funcţional. La om, Kalk a urmărit repetat laparoscopic, timp de doi ani, o hepatită cu atrofie galbenă, observînd refacerea pînă la volumul iniţial a ficatului.

1. STRUCTURA MORFO-FUNCŢIONALĂ A FICATULUI

1.1. UNITATEA MORFO-FUNCŢIONALĂ A FICATULUI

Din punct de vedere morfo-funcţional acest organ este caracterizat prin *simplitatea arhitectonică*, asociată cu o mare *complexitate metabolică*. Planul său de organizare structurală este relativ unitar şi reductibil la repetarea unor unităţi morfo-funcţionale identice.

Scanned with OKEN Scanner

În privința naturii unității morfo-funcționale hepatice există mai multe concepții. Vom prezenta pe cele mai importante dintre ele pentru înțelegerea desfășurării proceselor metabolice din ficat.

1.1.1. LOBULUL HEPATIC

Ca unitate morfo-funcțională, este alcătuit din cordoane radiare de celule hepatice și din sinusoide, cu dispoziție pericentro-lobulară (în condiții normale — Kiernan), formînd un ansamblu hexagonal, în secțiune plană.

1.1.2. ACINUL HEPATIC

După Rapapport, acinul hepatic simplu, reprezintă o mică masă parenchimală, neregulată în dimensiune și formă, asamblată în jurul unei axe alcătuite din: arteriola hepatică, venula hepatică terminală, canaliculi biliari, vase limfatice și nervi. Un acin este așezat între două sau mai multe venule hepatice terminale centrale. Mai mulți acini simpli alcătuiesc un acin complex. În concepția Malpighi-Rappaport, acinul constituie *o unitate microcirculatorie*, în timp ce parenchimul conținut într-un cîmp hexagonal (lobulul) primește sînge din diferite arii mezenterice. Lobulul hepatic hexagonal nu ar reprezenta deci o unitate microcirculatorie și nici structurală, metabolică și secretorie. Arteriolele au un rol organizator în interiorul acinului hepatic simplu. Alimentînd cu oxigen aria periportală, ele creează ungradient al tensiunii acestui gaz în țesut, care descrește către vena centrală. Diferența tensiunii de oxigen între cele două zone, constituie premiza care conduce la împărțirea acinului în *trei zone microcirculatorii*, ce corespund unor *zonări metabolice*. Zona 1, periportală are tensiunea cea mai ridicată a O_2 iar zona 3 o are pe cea mai scăzută; zona 2 este intermediară din acest punct de vedere și ca potențial de activitate metabolică.

Fără a insista prea mult, se reamintește concepția *unității funcționale laminare* cu care se înrudește acea a *sinergidei* (Ziegmund) sau a hepatonului (denumit astfel prin analogie cu nefronul, unitatea morfo-funcțională renală). Hepatonul este format dintr-o lamelă de țesut hepatic și un sistem de sinusoide, orientate după gradientul de presiune, fie către vena centro-lobulară, fie către pachetul vascular din spațiul portal, făcînd și legătura dintre ele. Independent de concepția asupra naturii funcționale hepatice, la baza alcătuirii sale stă *hepatocitul*, cu trăsăturile structurale și metabolice caracteristice

1.2. HEPATOCITUL: CARACTERE STRUCTURALE ȘI METABOLICE

Hepatocitul aparține tipului de celule cu activitate diferențiată variată, cu numeroase funcții denumite de D. Green „ancilare" (energo-dependente). Profilul său funcțional este exprimat în tipul de mitocondrie pe care-l posedă, caracterizat prin număr redus de criste și matrice largă, în opoziție cu celulele specializate în fosforilarea oxidativă (tip celula miocardică, bogată în criste și cu spațiu matriceal mic). Aparatul mitocondrial fiind sediul fosforilării oxidative, asigură prin compușii macroergici, tip ATP, puntea de legătură dintre planul metabolic nespecific (cel energetic) și acela al activității diferențiate specifice. Abundența sistemului adenilic (principal ATP) este factorul condiționant al numeroaselor reacții endergonice, ce se petrec la nivelul celulei hepatice ca: sinteza colesterolului, a acizilor biliari, conjugarea bilirubinei prehepatice, procesele de lipogeneză, activarea metioninei (ca donator

Scanned with OKEN Scanner

de metil), ciclul ornitinei pentru ureogeneză, sintezele proteice, sinteza acizilor nucleici, sintezele cofactorilor şi coenzimelor (NAD, NADP), procesele de inactivare hormonală, cît şi multiplele mecanisme de detoxifiere (cu sistem enzimatic microzomal).

În ficat, mai mult decît în orice alt organ, interdependenţa metabolismelor hidraţilor de carbon, grăsimilor, proteinelor constituie o condiţie indispensabilă a multiplicităţii sale funcţionale. „Fondul metabolic" intracelular (metabolic pool) format din totalitatea compuşilor de carbon cu moleculă mică conţinînd unu, doi, trei sau patru atomi de carbon (C_1*, C_2, C_3, C_4) rezultaţi din procesele catabolice şi utilizaţi ca piese de construcţie în anabolism, este extrem de larg implicat în activitatea specifică a celulei hepatice. Alături de marea capacitate anabolizantă a celulei hepatice, trebuie subliniată în mod special *caracteristica sa energetică*, anume aceea de a degrada glucoza într-o proporţie însemnată (după Popper 75%, după Fischer şi alţii 50%, sau în orice caz preponderent) pe calea sunetului hexozomonofosfaţilor, în timp ce alte ţesuturi utilizează această cale într-o măsură mult mai mică.

După cum s-a menţionat în capitolul IX — privind glucidele, pe această cale de degradare a glucozei nu se formează concomitent ATP, dar se produce o altă componentă importantă — $NADPH_2$ — necesară multor sinteze reductive (colesterol, acizi graşi), cît şi pentru acizii nucleici producînd pentoze; de asemenea, se obţin şi compuşi cu patru atomi de carbon (eritroza) şi cu şapte atomi de carbon (sedoheptuloza), constituenţi celulari importanţi.

1.3. PROFILUL ENZIMATIC HEPATIC

Se va contura integrarea enzimo-structurală şi funcţională la nivelul ficatului, urmărind profilarea enzimatică pe trei trepte de organizare: hepatocitul, unitatea morfofuncţională hepatică şi organul întreg. Metodele moderne analitice, bazate — în special — pe studii complexe de microscopie electronică, centrifugare diferenţială cito, şi histo, chimie enzimatică şi a celorlalţi constituenţi cito-spectro-fotometria şi histo-spectrofotometria au dat posibilitatea conturării unui profil enzimo-structural la nivel celular sau la nivelul unităţii morfo-funcţionale hepatice (lobulul sau acinul hepatic). Studiile făcute pe omogenate şi secţiuni — experimental şi clinic — în biopunctate şi fragmente prelevate intraoperator, au condus la schematizarea unui profil enzimatic al ficatului normal şi patologic a cărui reflectare umorală constituie unul din elementele de bază în explorarea modernă a sindromului biologic al afecţiunilor hepatice acute şi cronice.

1.3.1. HEPATOCITUL

Dintre celulele animale şi umane hepatocitele sînt poate cel mai bine studiate. Faptul se datoreşte atît disponibilităţii lor uşoare — chiar la om prin biopuncţie hepatică, practicată azi în mod curent — cît şi uşurinţei cu

* Multipla utilizare a unităţilor de C_1 sub forma activă a acidului formil-tetrahidrofolic (FTHA) şi a variantelor sale şi mai ales a celor de C_2 sub forma activată de acetil CoA sau a glicocolului (fond metabolic pentru sinteza porfirinelor, a purinelor, a pirimidinelor, a serinei şi creatininei) şi în sfîrşit utilizarea unităţilor C_3, — glicerol, acid lactic — pentru sinteza glicogenului, situează ficatul ca centru de sinteze în economia organismului întreg.

Scanned with OKEN Scanner

care elementele ultrastructurale (nucleii, mitocondriile, reticulul endoplasmatic, lisosomii, ribosomii), pot fi obţinute prin centrifugarea diferenţială a omogenatelor de ficat în sucroză (zaharoză).

Cu ajutorul metodei trasorilor izotopici s-a arătat (la şobolani) că hepatocitul prezintă caracteristica metabolică a celulelor ce se pot adapta rapid la schimbări în compoziţia mediului nutritiv exogen, posedînd un dinamism reacţional foarte viu. Rata înaltă de sinteză a proteinelor este contrabalansată de o rată relativ ridicată de degradare. În continuare se fac unele

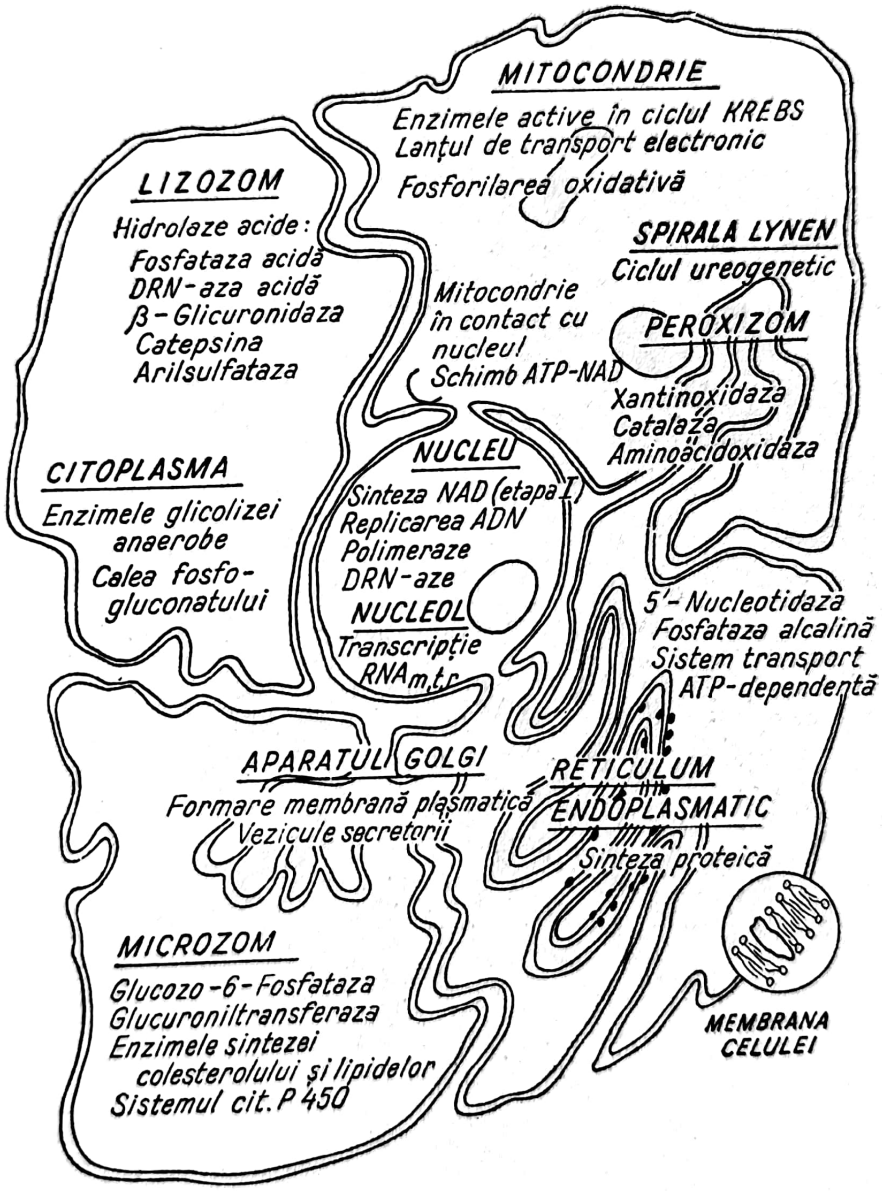


Fig. XVI.2. Compartimentarea enzimelor la nivelul ultrastructurilor hepatice (adaptare după Lehninger).

precizări asupra compartimentării enzimelor la nivelul ultrastructurilor hepatice, cu indicarea secvenţei metabolice în care ele activează (fig. XVI.2).

Subliniem faptul că distribuţia biloculară a reacţiilor de catabolizare ale aminoacizilor cît şi ale ciclului de sinteză a ureii între citosol şi mitocondrii,

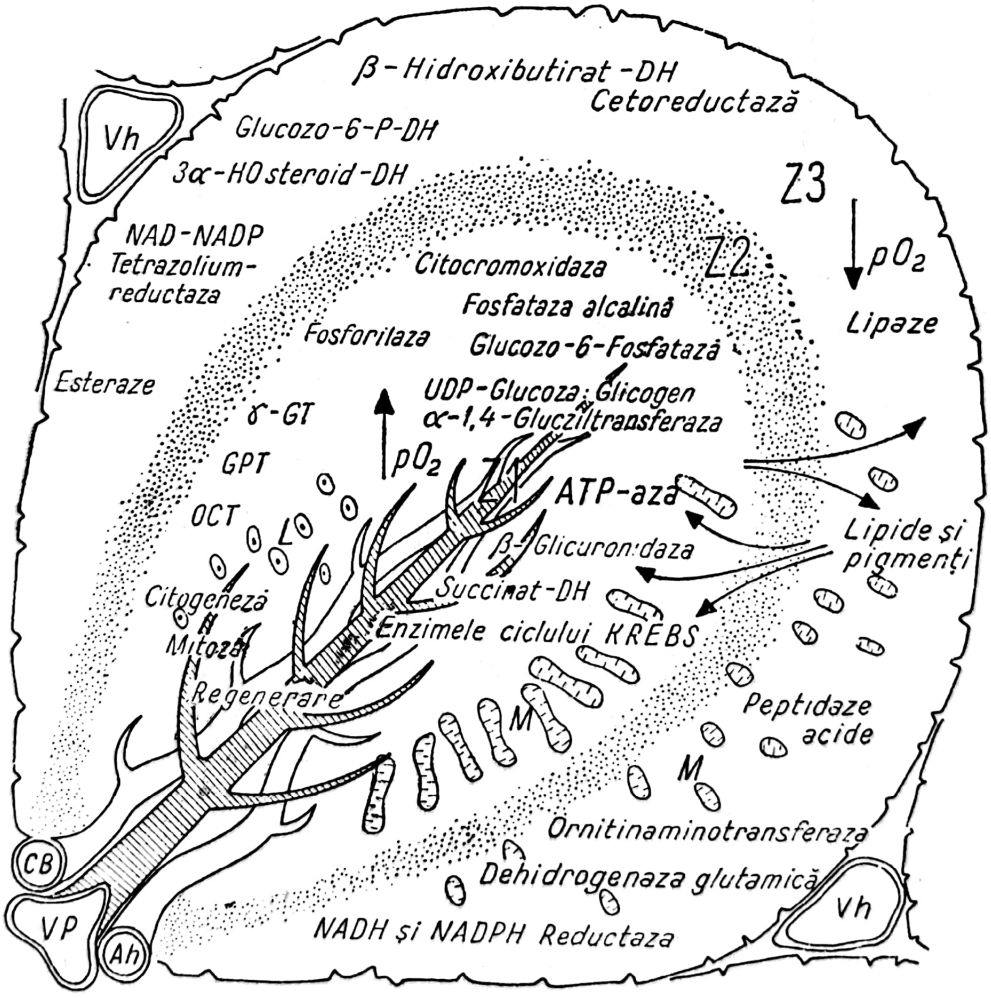
Scanned with OKEN Scanner

realizează compartimentarea necesară pentru a preveni acumularea NH_3 liber, toxic al sistemului nervos central la toate vertebratele ureotelice.

1.3.2. UNITATEA MORFO-FUNCȚIONALĂ A FICATULUI

Studiile de histo- și cito-chimie dovedesc eterogenitatea celulară în interiorul unității morfo-funcționale hepatice. Distribuția diferențială a enzimelor în interiorul celulelor traduce distribuția suporturilor structurale de care ele sînt legate. Integrînd hepatocitul în ansamblul unității morfo-funcționale a ficatului, fie că se acceptă acinul, fie că se menține conceptul de lobul hepatic, se observă că organizarea metabolică este strîns corelată cu direcția curentului sanguin. Astfel, în cazul acceptării *acinului* ca unitate morfo-funcțională, diferența de irigație arterială și de presiune parțială de O_2 concordă cu o anumită distribuție zonală a activităților metabolice și a enzimelor implicate în desfășurarea lor (fig. XVI.3).

În zona 1 periportală, unde se deschid arteriolele, se găsesc mitocondrii mari, alungite, în care procesele oxidative pe calea ciclului Kebs se petrec



VP = vena porta; CB = canalicul biliar; Ah = artera hepatică; Vh = vena hepatică; M = mitocondri; L = lizozomi

Fig. XVI.3. Distribuția zonală a activităților metabolice a enzimelor implicate în acinul hepatic (adaptare după Rappaport).

la un nivel ridicat, cu sistem succin-oxidazic foarte activ. Activităţile enzimatice implicate în glicogeneză sînt foarte intense (glicogen sintetaza=UDP-glucozo-glicogen α 1, 4-glucoziltransferază-UDPGGT-fosforilaza, glucozo-6-fosfataza). Lisosomii numeroşi bogaţi în hidrolaze acide, ca fosfataza acidă în special, facilitează în această zonă viteza de preluare şi pinocitoză a materialelor aduse prin vena portă. Tot aceasta este zona activităţii intense în metabolismul proteic (sinteza proteinelor plasmatice). *Zona 2* este o arie de tranziţie, care se orientează funcţional către regimul zonelor 1 sau 3, în funcţie de creşterea sau descreşterea fluxului arteriolar, în unitatea morfo-funcţională respectivă. *Zona 3* perivasculară, în care presiunea parţială a oxigenului este aproape de cea venoasă, este mai săracă în mitocondrii, care sînt dealtfel mai mici decît în zona 1. La acest nivel activează sistemele NAD, NADP-tetrazoliu reductazic (diaforazele) precum şi NADH şi NADPH-reductazele. În această arie se depozitează glicogenul şi se formează pigmenţii biliari şi grăsimile. Zona respectivă este şi sediul microsomilor activi în detoxifiere şi biotransformarea medicamentelor (prin sistemul Cit P 450, NAD PH-reductaza, Cit b5, NADH-reductaza). Faza 1 a metabolizării medicamentelor prin procese oxidoreducătoare, care conduc la hidroxilarea substanţelor, se petrece intens în reticulul endoplasmatic neted a hepatocitelor din această zonă. Faza a II-a a transformării, în special, glucuronidarea, se pare că se desfăşoară mai eficient în zona I (Z_1).

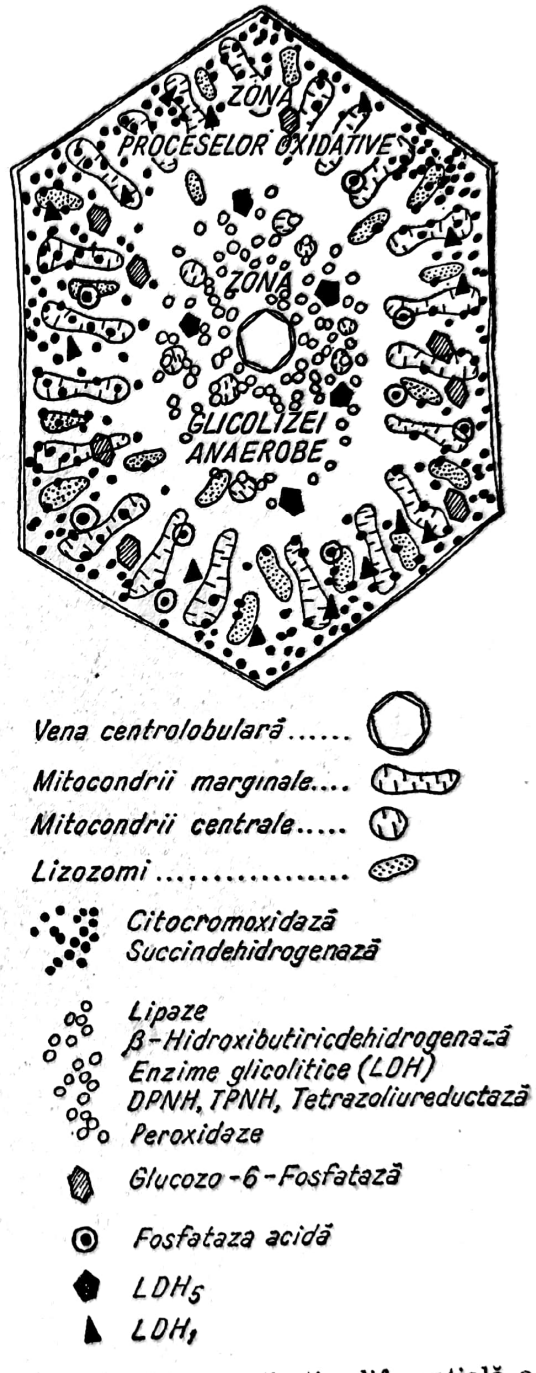


Fig. XVI.4. Distribuţia diferenţială a enzimelor în lobulul hepatic.

Cele trei zone microcirculatorii şi funcţionale prezintă şi grade diferite de susceptibilitate la agresiuni toxice, hipoxie, anoxie sau malnutriţie.

În concepţia *lobulului hepatic* ca unitate morfo-funcţională, heterogenitatea celulară este exprimată în diferenţele de distribuţie, intensitate a activităţilor enzimatice şi a proceselor metabolice dintre centrul şi periferia lobulului. Astfel, se observă o înaltă activitate succinoxidazică (citocromoxidază-succindehidrază) la periferia lobulului, în spaţiul periportal, unde se găsesc şi numeroase mitocondrii alungite. Această distribuţie sugerează

interpretarea că în celulele periferice, primele expuse sîngelui care intră în lobul, procesele oxidative pe calea ciclului Krebs, au un nivel energetic ridicat. În aceeaşi zonă celulele sînt bogate în glucozo-6-fosfatază, activitate legată de metabolismul glucogenului şi de reglarea homeostaziei glucozei din sînge. În celulele periferice se găsesc şi numeroşi lizozomi bogaţi în fosfatază acidă. În celulele centro-lobulare, din jurul venei care transportă sîngele ce părăseşte lobulul reacţiile citocromoxidazei şi succindehidrazei sînt mai puţin intense, mitocondriile rotunde mai mici şi mai puţine decît în periferia lobulului. În zona centro lobulară sînt active enzimele glicolitice (LDH în special LDH_5), NADPH şi NADH-tetrazoliu reductazele, lipaza, β-hidroxibutirat-dehidrogenaza, precum şi peroxidazele. Toate aceste date sînt schematizate în fig. XVI.4).

1.3.3. PROFILUL ENZIMATIC AL ORGANULUI ÎNTREG

Activităţile enzimatice hepatice, studiate experimental — pe omogenate şi secţiuni — şi clinic în biopunctate, au permis schematizarea unui profil enzimatic de ansamblu al ficatului normal şi patologic, avînd ca fundament cercetări din ultimile două decade (De Ritis, E. Schmidt, V. Schmidt, Wildhirt, Popper, Kalk, Waterlow, Iselbacher). Ca trăsături generale, reies următoarele:

— *preponderenţa* deja subliniată a şuntului hexozomonofosfaţilor, ca mod de degradare a glucozei, ce se reflectă atît în profilul enzimatic normal cît şi în cel patologic. Acest caracter este bine scos în evidenţă de Iselbacher;

— *prezenţa unor enzime specifice ficatului:* fructozo-1-fosfat-aldolaza, sorbitol-dehidrogenaza, oritin-carbamil-transferaza (OCT), arginază, urocanaza, guanaza;

— *prezenţa în cantitate apreciabilă* a cinci enzime glicolitice, care fac din ficat al doilea deţinător, după alte ţesuturi (muşchi scheletic, eritrocite) de: gliceraldehid-3-fosfat-dehidrogenaza (GAPDH), fructozo-1-6-difosfat-aldolaza, enolaza, piruvat-kinaza şi fructozo-1-fosfat-aldolaza.

— *prezenţa unor enzime caracteristice* (deşi nu specifice) multiplelor potenţialităţi metabolice ale ficatului: glutamat-dehidrogenaza mitocondrială şi 3 enzime biloculare (cu forme mitocondriale şi citoplasmatice): GOT, ICDH, MDH; 3 enzime citoplasmatice, hexokinaza, GPT, LDH (în special, forma sa moleculară electroforetic lentă, LDH_5).

O bună parte din aceste observaţii au rezultat din studiile comparative făcute de E. Schmidt şi W. Schmidt pe următoarele ţesuturi şi organe: ficat, pancreas, plămîn, muşchi scheletici, muşchi uterin, miocard, mucoasă gastrică, ţesut sarcomatos.

2. FUNCŢIILE FICATULUI ŞI BAZELE LOR MOLECULARE

Prin cele două tipuri de celule ale sale, celulele parenchimatoase şi acele ale sistemului reticulo-histiocitar, ficatul îndeplineşte complexele sale funcţii ce pot fi grupate în trei mari categorii: *participarea la procesele metabolice; secreţia bilei; detoxifierea.*

Scanned with OKEN Scanner

2.1. PARTICIPAREA FICATULUI LA PROCESELE METABOLICE

În linii mari, bogata activitate biochimică a organului în cadrul metabolizării glucidelor, lipidelor şi proteinelor este dublată de o importantă acţiune asupra metabolismului hidric şi hidromineral (inactivarea hormonului antidiuretic şi a hormonilor steroizi).

Materialele primite de ficat prin vena portă, vin în contact cu una din cele două linii celulare importante din ficat — celulele parenchimatoase şi celulele SRH — unde, în funcţie de natura lor, sînt supuse unei prelucrări adecvate. Astfel, substanţele inerte şi particulele de dimensiuni mai mari sînt fixate în celulele lui Kupffer. Componentele chimice sînt metabolizate la nivelul celulelor parenchimatoase.

Pentru a prezenta participarea ficatului la procesele metabolice expuse în capitolele IX, X, XI, XII, vom reaminti numai în mod rezumativ, rolul acestui organ în diferitele secvenţe ale metabolismului intermediar şi se va accentua asupra particularităţilor proprii acestui ţesut.

2.1.1. ROLUL FICATULUI ÎN METABOLISMUL GLUCIDIC

Rolul principal al ficatului în această sferă metabolică constă în asigurarea glucozei sanguine. Acest echilibru dinamic se realizează pe de o parte, atît prin depozitarea glucozei ca glicogen, cît şi prin mobilizarea ei din acest rezervor. Reamintim că primul stadiu al glicogenogenezei, constă într-o fosforilare a glucozei, catalizată de glucokinază, care se manifestă ca o enzimă adaptativă, a cărei activitate scade în perioadele de post*. Fosforilarea glucozei poate fi catalizată şi de hexokinază.

Persistă unele incertitudini asupra structurii glicogenului hepatic, tipului de legătură între unităţile de glucoză şi nu se cunoaşte bine nici modul cum glicogenul se asociază cu celelalte componente şi mai ales cu proteinele celulare. Se ştie că există glicogen liber, uşor extractibil şi desmoglicogen greu extractibil. Depunerea glicogenului ca „rezervă", pare să fie în raport cu creşterea greutăţii moleculare a polizaharidului mai degrabă decît cu creşterea numărului de molecule de glicogen. S-ar părea că depleţia rezervelor de glicogen din ficat n-ar face decît să scadă dimensiunea macromoleculei, fără să schimbe numărul de molecule.

Moleculele de glicogen de dimensiuni diferite nu par să participe în acelaşi mod la metabolism. Prin cercetări cu glucoză marcată, făcute pe ficat, se observă că încorporarea se face principal în moleculele de glicogen cu greutate moleculară mică (în timp ce în muşchi situaţia este inversă).

Ficatul este singurul organ ce poate să utilizeze pentru sinteza glicogenului, pe lîngă glucoză şi alte hexoze (fructoza, manoza şi D-galactoza). Prezenţa în ficat a cetokinazei şi a galactokinazei explică posibilitatea sintezei glicogenului, avînd ca punct de plecare D-fructoza şi D-galactoza**. El este totodată şi singurul organ ce poate asigura glicogen plecînd de la acid lactic, glicerol sau alţi metaboliţi intermediari, provenind din lipide sau proteine.

---

* Se notează scăderi de peste 50% din activitatea sa fosforilantă, după două zile de post.

** Printre probele de explorare funcţională hepatică s-a practicat în trecutul apropiat proba galactozuriei provocate, după administrare orală de galactoză.

Scanned with OKEN Scanner

Este fenomenul cunoscut sub denumirea de gluconeogeneză. Reglarea acestor procese se face automat în ficat sau pe cale neuroendocrină, prin influențarea proceselor enzimatice care intervin în glicogeneză și glicogenoliză. Căile gluconeogenezei trec toate printr-o verigă comună, acidul oxalacetic (din ciclul Krebs). În ficat acidul oxaloacetic este sintetizat prin fixarea directă a CO_2 la piruvat, sau prin carboxilare catalizată de enzima malică (Salles și Ochoa) dar mai cu seamă prin carboxilarea acidului fosfoenolpiruvic, catalizată de fosfoenol-piruvat-carboxikinaza (sintetizată în ficat sub influența cortizonului). Reglarea sintezei și degradării glicogenului se face printr-un mecanism complex de interacții hormonale și reacții în „cascadă" (capitolele IX și XIII).

În legătură cu participarea ficatului la metabolismul glucidelor, trebuie subliniată și capacitatea sa de a sintetiza heparină, substanță anticoagulantă, precum și prezența anumitor enzime implicate în metabolismul glico-proteinelor ca N-acetilglucozamin-kinaza și N-acetilgalactozamin-kinaza.

2.1.2. ROLUL FICATULUI ÎN METABOLISMUL LIPIDIC

Ficatul joacă în metabolismul lipidic un rol deosebit de important, contribuind la realizarea tuturor stadiilor metabolice ale transformării și sintezei substanțelor grase. Bogăția în grăsimi a ficatului, cît și conținutul său ridicat în acizi grași nesaturați (dar cu o singură dublă legătură) constituie o trăsătură caracteristică. În același sens trebuie subliniată și marea bogăție a ficatului în CoA, indispensabilă oxidării și sintezei acizilor grași, sintezei colesterolului, degradării resturilor piruvice pe calea ciclului acizilor tricarboxilici. Importanța rolului pe care ficatul îl joacă în metabolismul lipidic este subliniat și de frecvența steatozei hepatice în tabloul anatomo-clinic al afecțiunilor hepatice.

Hepatocitul posedă capacități reactive care fac din ficat organul principal pentru realizarea următoarelor procese:

— *preluarea lipidelor alimentare* în principal a trigliceridelor, sub formă de chilimicroni, a acizilor grași cu un număr mijlociu de atomi de carbon în catenă;

— *captarea acizilor grași* proveniți din lipidele țesutului adipos și vehiculați de albumina serică spre ficat;

— *sinteza acizilor grași** avînd drept sursă principală diverșii metaboliți intermediari glucidici, în special, triozo-fosfații metabolizați — mai departe — în acetil-CoA. Acizii grași sintetizați sînt utilizați pentru formare de triglyceride, pe care hepatocitul le încorporează în pre β-lipoproteine (VLDL). Trigliceridele din aceste formațiuni sînt asociate cu esterii de colesterol și legate de fosfoaminolipide care — la rîndul lor — sînt unite cu moleculele de serină sau treonină din capetele N-terminale ale lanțurilor peptidice ale globulinelor respective;

— *remanierea metabolică a acizilor grași* privind: (a) elongația lanțului de carbon (cu formare de acizi grași cu 24 atomi de C, ce intră în constituția sfingolipidelor); (b) desaturarea, cu transformarea acidului linolenic în acid

---

* Intensitatea sintezei acestora este direct proporțională cu disponibilitatea celulară în NADPH și NADH. Factorii ce determină creșterea nivelului de NADH, anoxia ce încetinește transformarea sa în NAD, precum și alcoolul etilic, a cărui oxidare prin AL-DH generează NADH, favorizează sintetaza acizilor grași și apariția steatozei.

Scanned with OKEN Scanner

arahidonic şi a acidului oleic în acid eicosatrienoic; (c) *peroxidarea* acizilor polinesaturaţi astfel formaţi, cu intervenţia posibilă a peroxizilor lipidici în determinismul citosteatonecrozei;

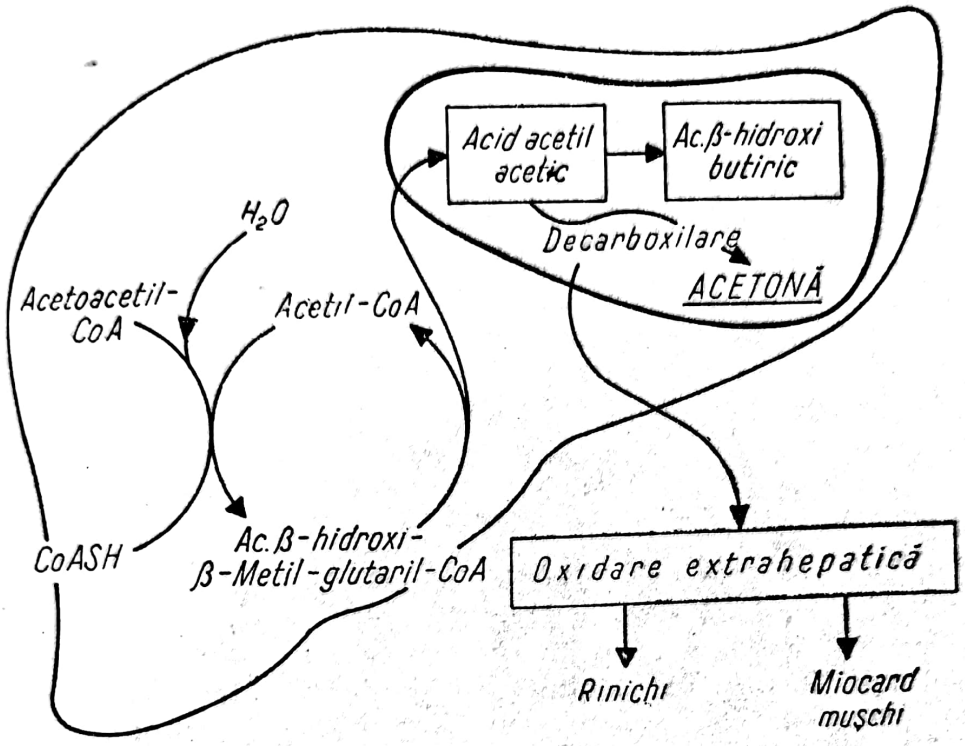


Fig. XVI.5. Rolul ficatului în metabolismul corpilor cetonici.

— *catabolismul acizilor graşi* prin β-oxidare, procese ce solicită prezenţa a numeroşi cofactori, carnitină şi CoA sintetizate plecînd de la acid pantotenic şi aminoacizi cu sulf (capitolul X);

— *formarea corpilor cetonici* ca rezultat al β-oxidării, cu formare de acid acetilacetic, a produsului său de reducere, acidul β-hidroxibutiric şi a produsului său de decarboxilare, acetona. Corpii cetonici formaţi reprezintă substraturi cu mare valoare energetică, care sînt utilizaţi pe loc sau extrahepatic; mai ales în rinichi şi miocard (care-i catabolizează preferenţial faţă de glucoză) (fig. XVI.5).

Ficatul, împreună cu muşchiul şi ţesutul adipos este implicat în ciclul glucoză-acizi graşi, a cărui importanţă biologică ţine de faptul că excesul de glucoză favorizează sinteza de trigliceride şi inhibă liberarea acizilor graşi, în timp ce în lipsă de glucoză fenomenul se petrece invers. Ciclul respectiv are o deosebită importanţă pentru reglementarea dieteticii în cazurile de hiperlipoproteinemie de tip II_b sau IV (fig. XVI.6).

— *Metabolismul fosfatidelor*. Toate organele pot realiza biosinteza fosfatidelor proprii, însă ficatul este singurul organ ce le poate transmite în plasmă. Fosfatidele plasmatice sînt deci singurele de origine hepatică. Biosinteza fosfatidelor presupune însă etape anterioare, în care sînt produse componentele structurale ale acestor molecule complexe (glicerol sau sfingozină, acizi graşi şi o bază azotată; acidul fosforic fiind preluat, după hidroliză, din fosfaţii

existenţi în celulă). Această necesitate pune pe prim plan, la nivelul celulei hepatice, sinteza etanolaminei din serină — glicocol şi a colinei din etanol amină, printr-un proces de metilare. Sursa principală a grupărilor metil

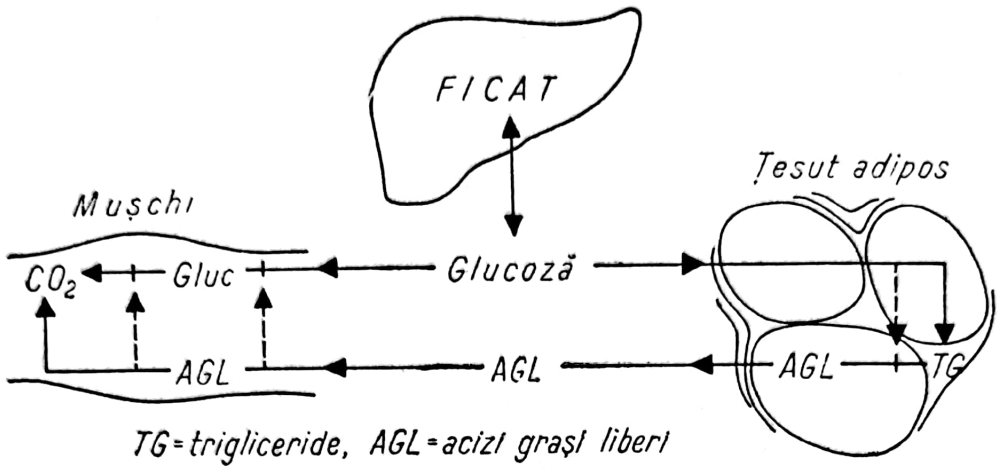


Fig. XVI.6. Schema ciclului glucoză — acizi graşi (după Rapoport).

este metionina, sub forma sa de metionină activă — „S adenozin-metionină". După unii autori numai una din grupările metil ale colinei ar proveni direct din S-adenozin metionină, celelalte două avîndu-şi originea în fondul metabolic al unităţilor C_1. Se reaminteşte o particularitate a biosintezei fosfatidelor care constă în participarea derivaţilor citidinfosfatului: CDP diglicerid, CDP-colină, CDP-etanolamină. Trebuie subliniat şi faptul că ficatul posedă o glicerol-kinază activă, fiind ţesutul care deţine rolul principal în utilizarea metabolică a glicerolului.

Metabolismul colesterolului, adică: biosinteza, esterificarea şi transformarea sa în acizi biliari, sînt prezentate în Cap. X. Hepatocitul este sediul principal al biosintezei colesterolului din acetat activ (acetil CoA), aşa cum s-a arătat.

În organism se sintetizează 1,50—2 g colesterol, sinteza endogenă depăşind aportul exogen. Două treimi din cifra colesterolemiei este de natură endogenă; o treime este esterificat sub acţiunea lecitin-colesteril-acil-transferazei.

2.1.3. ROLUL FICATULUI ÎN METABOLISMUL PROTEIC

Intervenţia ficatului în metabolismul proteic este de cea mai mare importanţă. Ea se exercită în două direcţii vitale pentru organism:

2.1.3.1. *Metabolismul aminoacizilor.* Degradarea aminoacizilor se face cu reutilizarea şi integrarea amoniacului provenit din dezaminări, în uree şi glutamină, pe calea *ciclului ornitinei* (Krebs-Henseleit), *specific ficatului* şi a formării amidei acidului glutamic (glutamina) sub acţiunea glutaminsintetazei. Acest din urmă proces de neutralizare constituie însă şi mecanismul principal de îndepărtare a amoniacului, la nivelul creierului. Tulburarea mecanismelor de îndepărtare a amoniacului duce la instalarea encefalopatiei porto-cave. Ficatul de altfel, este singurul organ pentru care conţinutul în amoniac este mai scăzut în sîngele eferent, decît în cel aferent, datorită întinsei acţiuni de blocare a NH_3 pe calea ciclului ureogenetic.

Scanned with OKEN Scanner

Etapa specific hepatică a procesului este transformarea ornitinei în citrulină, sub acțiunea OCT (ornitincarbamil-transferazei). Transformarea citrulinei în arginină se poate realiza și la nivelul rinichiului.

Unii aminoacizi au, la nivelul ficatului, o utilizare metabolică particulară: încorporarea glicocolului în acizii glicocolici, transmetilarea metioninei, desulfurarea cisteinei, transaminarea tirozinei, oxidarea acidului homogentizic, formarea acidului urocanic, degradarea kinureninei. Acidul cisteic este transformat, sub acțiunea amino-acid-decarboxilazei, în taurină care este încorporată în acizii biliari tauro-colici. Aminoacizii glicoformatori pot fi utilizați după dezaminare în gluconeogeneză.

2.1.3.2. *Metabolismul proteinelor.* Ficatul sintetizează, pe lîngă proteinele proprii, structurale, o bună parte din proteinele plasmatice: albumina, α-2-globulina-ceruloplasmina, α și β-lipoproteinele, o parte din factorii proteici ai coagulării (prototrombina, proconvertina, proacelerina, fibrinogenul). În celulele mezenchimale sînt sintetizate imunoglobuline (IgG, IgM).

În procesele catalitice ficatul degradează nucleoproteinele pînă la acidul uric (la om și mamifere*) sub acțiunea xantinoxidazei. El reprezintă și sediul principal al catabolizării pirimidinelor.

2.1.4. ROLUL FICATULUI ÎN METABOLISMUL PORFIRINELOR

Ficatul participă atît la sinteza cît și la degradarea porfirinelor. În patologie sînt cunoscute porfiriile hepatice primare, dintre care cea mai importantă „porfiria cutanea tarda", caracterizată prin hipersinteză și eliminare urinară de uro- și copro-porfirina I. În hepatite și ciroze apar coproporfirinurii secundare cu izomeri de tip I, iar în intoxicațiile alcoolice și ciroza etilică izomeri de tip II.

2.1.4.1. *Producerea bilirubinei.* Produsul principal al degradării porfirinelor este bilirubina, pigmentul biliar roșu-oranj, care posedă încă cele patru inele pirolice. În plasmă pigmentul circulă ca bilirubină totală, alcătuită din două componente: bilirubina legată de albumină, neconjugată, denumită indirectă și bilirubina glucuronată (mono- și diglucuronată) liberă, numită directă, în raport cu reacția de diazotare, Hijmans Van Den Bergh. Nivelul bilirubinei totale în serul normal este 0,1—1,2 mg % sau 17 μ moli/l. În condiții normale bilirubina provine 85% din degradarea hemoglobinei eritrocitare iar restul de 15% își are originea în degradarea altor hemproteine ca: mioglobina, citocromii și alte enzime hemice (catalaze, peroxidaze, citocromoxidaze).

Bilirubina directă (conjugată cu acid glucuronic) circulă liberă în sînge. Bilirubina indirectă (primară, neconjugată) este transportată prin legare cu albumina, parțial sub forma de complex albumină-fosfatide și în cantități mici legată și de metale, aminoacizi, peptide sau alte molecule mici. În bilă se găsesc esterii de bilirubină cu acizii sulfuric și acizii aldobiuronici, pseudoaldobiuronici și hexuronozilhexuronici. Prin legarea bilirubinei la fibrele elastice ale pielii și conjunctivei se produce simptomul icter (îngălbenirea pielii și conjunctivelor).

---

* Acizii nucleici sînt degradați pînă la alantoină la alte specii, care prin degradări succesive ajunge la *uree* și acid glicoxilic.

Scanned with OKEN Scanner

Producţia de bilirubină este de 35 mg dintr-un gram de hemoglobină, obţinîndu-se 250—300 mg bilirubină zilnic. Degradarea hemoglobinei la bilirubină se realizează în celulele stelate Kupffer din sistemul reticulo-histiocitar (SRH) hepatic care reprezintă sediul principal al procesului, splina şi măduva osoasă fiind organe care iau parte la această activitate.

2.1.4.2. *Glucuronoconjugarea şi eliminarea bilirubinei.* Atît bilirubina formată în celulele Kupffer, cît şi cea produsă extrahepatic, este conjugată în ficat cu acidul glucuronic şi eliminată prin bilă în intestin.

Primele trepte ale degradării hemoglobinei nu sînt complet clarificate. După unele ipoteze prima etapă a degradării inelului porfirinic dă naştere verdoglobinei care se transformă apoi în bilirubină. După interpretări mai noi se acceptă ca mai probabilă iniţierea procesului prin liberarea hemului sub formă de hematină. Oxidarea în biliverdină s-ar produce în reticulul endoplasmatic prin sistemul Cit P-450 cu O_2 molecular. În această reacţie s-ar elibera CO. Reducerea biliverdinei în bilirubină s-ar face printr-o $NADPH_2$ reductază a cărei sinteză poate fi indusă prin oferta de hemoglobină. Bilirubina extrahepatică (sau prehepatică) este transportată, după cum s-a mai menţionat de către albumină. Bilirubina plasmatică ajunsă în ficat, ca şi majoritatea celei de provenienţă locală, este conjugată cu acidul glucuronic printr-o reacţie UDP-dependentă, ce va fi prezentată în cadrul procesului de detoxifiere la nivelul ficatului.

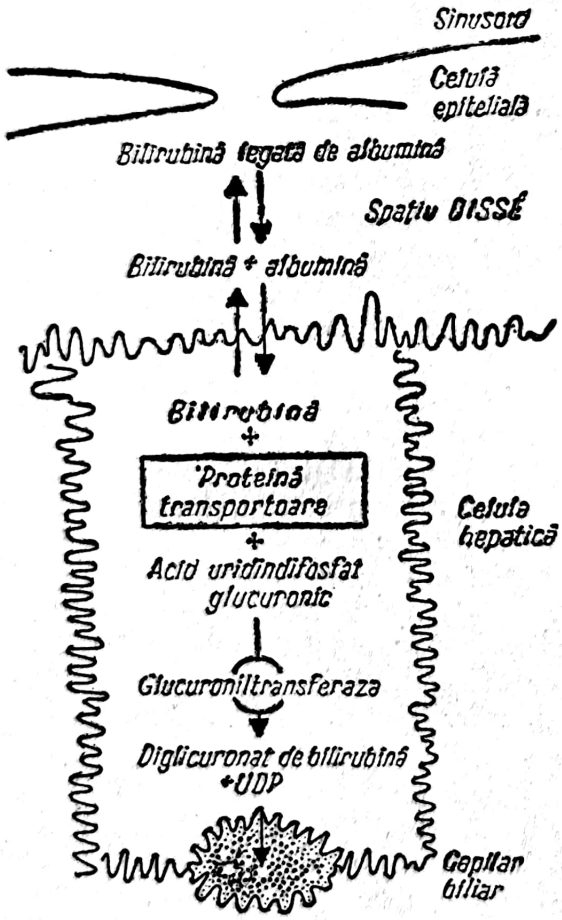


Fig. XVI.7. Procesul de eliminare a bilirubinei la nivelul celulei hepatice (adaptare după Petrides).

Enzima activă este UDP-glucuroniltransferaza. Una sau două molecule de acid glucuronic sînt esterificate cu resturile de acid propionic din bilirubină. În cantitate mică bilirubina este eliminată liberă în bilă, unde împreună cu cea glucuronată reprezintă principalii pigmenţi biliari (alături de mezobilinogen cca 10%).

În procesul de eliminare a bilirubinei la nivelul celulei hepatice joacă un rol important o proteină transportoare, ligandina (greutate moleculară 44 000), ea reprezintă cca 6% din totalul proteinelor hepatice. Prin glucuronare bilirubina este trecută în forma hidrosolubilă de glucuronat de bilirubină, ce se elimină normal prin bilă, iar în situaţii patologice şi prin urină (fig. XVI.7).

În intestin, bilirubina este redusă sub acţiunea bacteriilor intestinale, cu formare de bilani, stercobilinogen şi N-urobilinogen (mezobilinogen). Prin retroresorbţie în intestinul subţire urobilinogenul este degradat în ficat într-un produs dipirolic (propendiopent). O mică parte din urobilinogen este eliminat în urină în cantitate de 0,64 mg—4 mg/24 h. Cea mai mare

parte este eliminată prin fecale 40—280 mg/24 h. Stercobilinogenul este retroresorbit în intestinul gros, transportat la și eliminat prin rinichi. *Oxidarea bilanilor în bilene* (mezobilină, urobilină, stercobilină) dau fecalelor culoarea brună, la care contribuie și mezobilifuscina, produs de polimerizare al compusului dipirolic. Prin alternanța și echilibrul dinamic dintre procesele de retro-

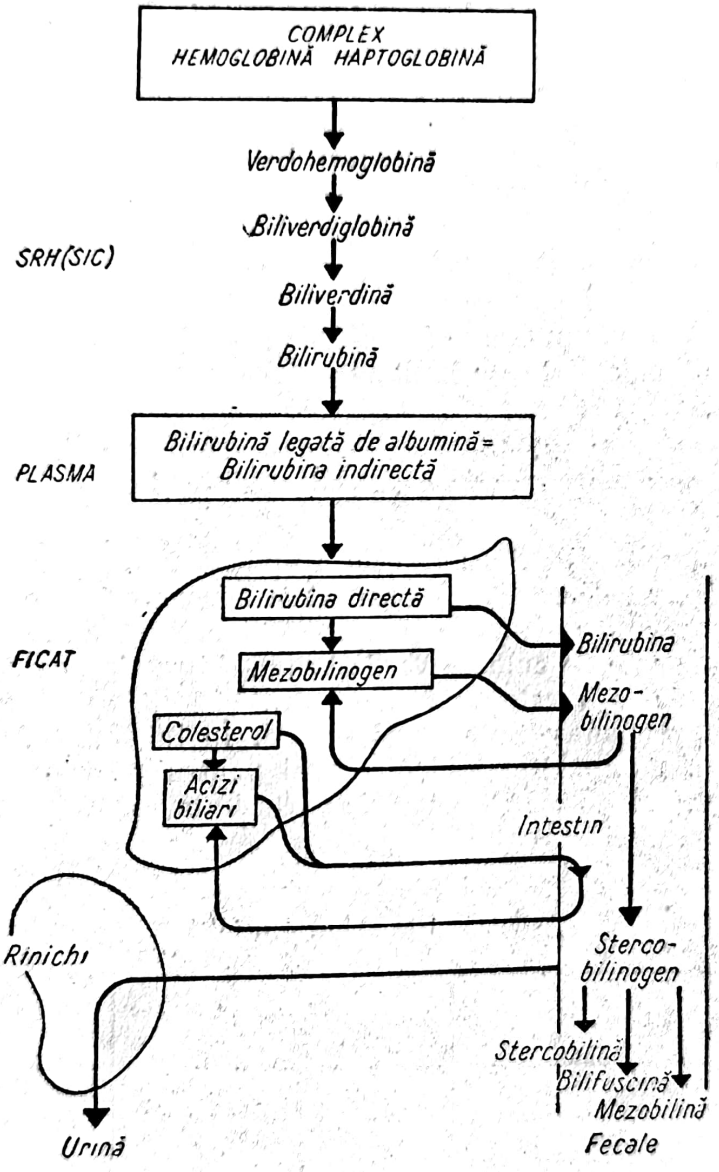


Fig. XVI.8. **Metabolismul bilirubinei: circuitul enterohepatic al bilirubinei glucuronate și al mezobilinogenului (după Rapoport).**

resorbție în intestin și de eliminare prin bilă și urină (urobilinogen), se stabilește un circuit enterohepatic pentru bilirubina glicuronată și mezobilinogen. În fig. XVI.8 este redat metabolismul bilirubinei cu circuitul menționat, împreună cu acela al colesterolului și acizilor biliari.

Rolul ficatului în metabolismul hormonilor și al vitaminelor, este prezentat în capitolele XIII și XX. Este de subliniat totuși rolul ficatului ca organ de depozitare a unor vitamine, precum și ca sediu al degradării unor

hormoni (hormon antidiuretic). Niacina (acidul nicotinic şi amida acidului nicotinic) activă ca vitamină, joacă un rol fundamental în metabolismul celular ca piatră de construcţie pentru coenzimele NAD şi NADP, implicate în activitatea multor dehidrogenaze. Ficatul este una din cele mai bogate surse alimentare de niacină conţinînd 10—25 mg/100 g masă ţesut proaspăt.

Carotenele, provitaminele A, sînt transformate în vitamina A şi aceasta este depozitată în ficat ca esteri cu acizi graşi. De asemenea, vitamina D, vitamina B_{12} şi vitamina K se depozitează tot în acest organ.

Funcţia de depozitare a ficatului se manifestă şi pentru unele oligoelemente: Fe, Cu, Mn, Zn. Fierul liberat în cursul degradării hemoglobinei este reutilizat sau pus în rezervă sub forma de feritină (hemosiderină).

2.2. SECREŢIA BILEI

Una din cele mai importante funcţii ale ficatului este producerea secreţiei sale externe — bila, care ajunge în duoden prin tractul biliar. Bila îndeplineşte două funcţii principale:

a) eliminarea unor substanţe endogene — produse finale ale metabolismului şi a unor substanţe străine ca: medicamente şi coloranţi de tipul bromsulfonftaleinei (BSP);

b) intervenţia în digestia şi resorbţia lipidelor. Bila secretată de hepatocite, *bila hepatică*, se deosebeşte ca aspect şi concentraţie de bila veziculară. Prima este limpede, galben-aurie şi aproape izotonică cu sîngele ($\Delta = 0°,54$) iar cea de a doua este de culoare verde brună (bilirubină oxidată), tulbure şi filantă. Bila veziculară este mai concentrată decît cea hepatică datorită rezorbţiei apei prin peretele veziculei biliare. În tabelul XVI.2 este redată compoziţia bilei. Compoziţia ionică a bilei pentru principalii săi electroliţi este: Na^+, 140 m val, Cl^-, 100 m val şi HCO_3 40 m val la litru. Cantitatea de

Tabelul XVI.2

Compoziţia chimică a bilei

Componenţi	Bilă hepatică g/l	Bilă veziculară g/l
Substanţă uscată	23—33	140—180
Acizi biliari	7—14	90—120
Colesterol	1—2	3—10
Pigmenţi biliari	0,3—0,6	1,5
Proteine	2	5

bilă secretată în 24 de ore este de 500—1 000 ml, iar sinteza zilnică a acizilor biliari componenţi esenţiali ai bilei, atinge în total 200—500 mg. Acizii biliari, ajunşi cu bila în duoden, sînt rezorbiţi în proporţie mai mare de 90% în ileon, cu ajutorul unui sistem de transport activ şi readuşi la ficat prin vena portă. Aici sînt reutilizaţi în secreţia bilei. Circulaţia enterohepatică a acizilor biliari se petrece cu viteză mare, aşa încît cantitatea totală a acestora intră în circulaţie de 6—10 ori. Dintre toate componentele bilei, se vor face referiri speciale la acizii biliari datorită importanţei rolului pe care-l joacă în metabolism şi

Scanned with OKEN Scanner

digestie. Acizii biliari prezenţi în bila umană sînt: acidul colic (25—60% din valoarea globală), acidul chenodezoxicolic (30—50%), acidul dezoxicolic (5—25%) şi acidul litocolic (cca 5%). Sinteza lor din colesterol a fost prezentată în Cap. X; ei reprezintă o formă de eliminare a nucleului steranic. Intervin în reglarea sintezei colesterolului. Administrarea unui schimbător de ioni nerezorbabil (colestiramina) are drept urmare fixarea acizilor biliari, cu împiedicarea retrorezorbţiei lor, fapt care conduce la scăderea sintezei colesterolului. Nivelul colesterolului sanguin scade, deoarece viteza de transformare a colesterolului în acizi biliari este intens crescută. Mecanismul acesta este aplicat în terapia patogenică a hipercolesterolemiei. S-a aplicat de asemenea şi tratamentul chirurgical al hipercolesterolemiei prin îndepărtarea ileonului ca loc de retrorezorbţie a acizilor biliari. Un alt rol important al acestor acizi în bilă este acela de mediator ai solubilizării colesterolului deoarece colesterolul este practic insolubil în medii apoase. Precipitarea lui este împiedicată numai prin formarea unei soluţii micelare, cu acizii biliari şi lecitina din bilă. Această corelaţie este reprezentată în fig. XVI.9. Diagrama, în coordonate triunghiulare dă posibilitatea evaluării solubilităţii maxime a colesterolului în bila veziculară.

Diagrama este construită pe baza cercetărilor experimentale, referitoare la raportul dintre amestec de acizi biliari, lecitină şi colesterol în apă. Se deduce că toate compoziţiile de bilă care situează concentraţia colesterolului deasupra

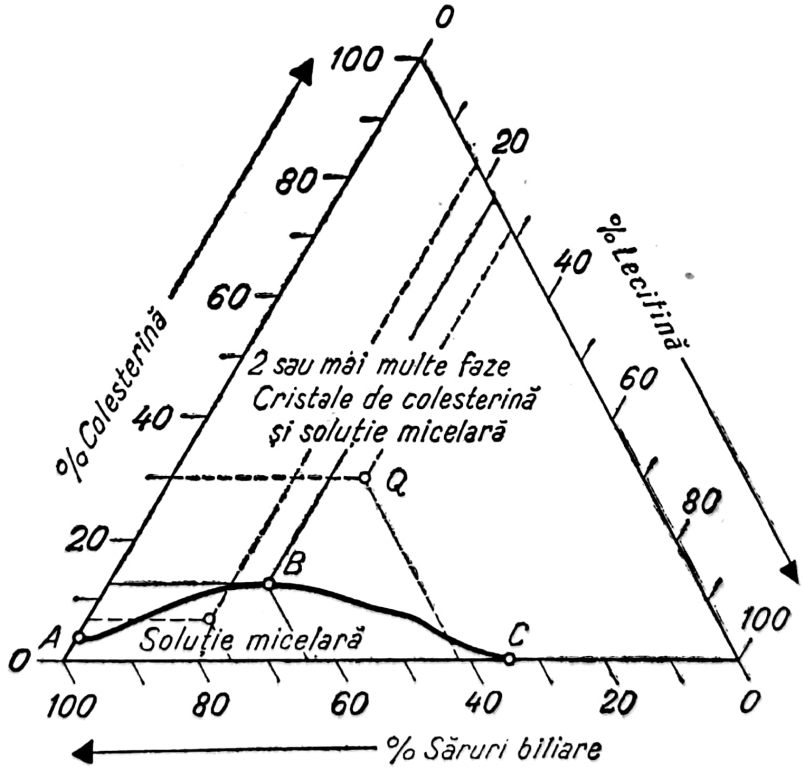


Fig. XVI.9. Formarea soluţiei micelare a colesterolului cu acizi biliari şi lecitina din bilă.

liniei ABC, conduc la formarea cristalelor de colesterol ce pot constitui nucleul calculilor biliari. Schimbările compoziţiei bilei, cu dezechilibrul celor trei factori implicaţi, ar reprezenta un factor patogenic important în litogeneza biliară.

Scanned with OKEN Scanner

În digestia grăsimilor acizii biliari din bilă datorită proprietăţilor tensioactive, contribuie la formarea miceliilor de săpunuri ai acizilor graşi şi monogliceridelor rezultate sub acţiunea lipazei pancreatice în intestin.

Reglarea formării bilei se face prin hormonul tisular, colecistokinină, pancreozimină. Colereticele stimulează secreţia biliară, iar substanţele colagene contracţia vezicii biliare.

2.3. FUNCŢIA DE DETOXIFIERE

În ficat se petrec numeroase transformări metabolice care fac nevătămătoare atît unele substanţe proprii, cît şi unele străine care pătrund în organism. Funcţia aceasta se exercită în două moduri ce se pot asocia şi completa: reducerea toxicităţii (de ex. a amoniacului prin captare în ciclul ureo-genetic,

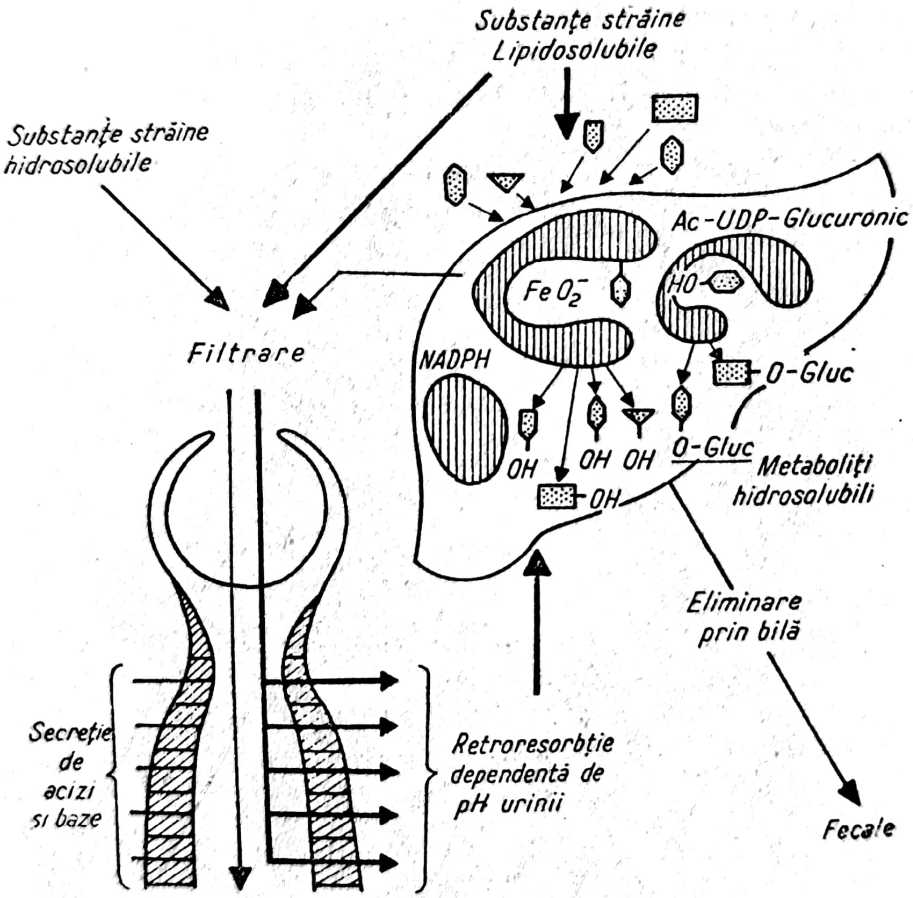


Fig. XVI.10. Transformarea componenţilor liposolubili în componenţi cu un grad mai ridicat de hidrosolubilitate. Cooperarea hepato-renală în procesul de detoxifiere.

specific ficatului) şi mărirea capacităţii de eliminare a produsului prin urină sau bilă. În esenţă, mecanismele de detoxifiere măresc polaritatea substanţelor, transformîndu-le din compuşi liposolubili, în componente cu un grad mai ridicat de hidrosolubilitate (fig. XVI.10).

Procesele de detoxifiere ce se petrec în ficat au cîteva trăsături caracteristice:

— *nu sînt selective şi nu sînt dirijate de o finalitate* prestabilită şi exclusivă·

Ele nu sînt obligatoriu „detoxifiante", după cum răspunsul imun nu este obligatoriu de apărare, ci poate fi direct patogen (imunopatologie);

— *o bună parte din enzimele active* implicate în detoxifierea substanţelor străine, *au o foarte mică specificitate* faţă de substrat. Substanţele endogene şi cele străine (medicamente de ex.), ce prezintă asemănări structurale cu aceasta, sînt metabolizate de enzimele denumite normale, biochimice sau parametabolice. Majoritatea medicamentelor şi o parte din substanţele străine sînt metabolizate de enzime denumite *xenobiotice*, mai puţin numeroase şi nespecifice. Cel mai important sistem din această categorie enzimatică este acela unic şi universal al oxidazelor (oxigenazelor) cu funcţii mixte (OFMM — D. Bedeleanu). Acestea se găsesc normal în stare inactivă şi pot fi induse sub aspectul substanţei străine (medicamentului) ce urmează a fi metabolizat.

— *Mecanismele de detoxifiere* funcţionează şi în metabolismul normal, pentru elaborarea de „excrete" normale, din organism;

— o substanţă este inactivată prin mai multe mecanisme concurente, cu preponderenţa unuia sau altuia (după specie).

Detoxifierea se realizează prin patru tipuri de reacţii chimice: oxidare, reducere, hidroliză şi condensări sau sinteze (în special, sub forma conjugării).

— Transformările detoxifiante se desfăşoară în două faze: faza I a proceselor de oxidoreducere şi hidroliză, finalizate prin hidroxilarea substratului şi faza II-a de sinteză (conjugare), conform schemei:

Medicament (substanţă străină) —faza I→ Oxidare, reducere şi/sau hidroliză —faza II→ sinteză (conjugări)

2.3.1. FAZA I. ACTIVITATEA SISTEMULUI MONOOXIDAZIC MICROZOMAL

Enzimele care acţionează în reacţiile de oxidoreducere din faza I utilizează lanţul de transport electronic microzomal şi alcătuiesc un sistem monooxidazic cunoscut sub denumirea de oxidaze (oxigenaze) cu funcţii mixte microzomale (microzomal mixed function oxidazes). Se mai numesc şi hidroxilaze microzomale, datorită hidroxilării finale a substratului ca efect al proceselor de oxidoreducere pe care le catalizează. Sistemul oxidazelor cu funcţii mixte are următoarele componente al căror rol funcţional este bine cunoscut pentru unele dintre ele, iar pentru altele trebuie încă studiat:

a) *Citrocrom P-450* (detalii în capitolul VIII privind respiraţia tisulară) funcţionează în formă oxidată şi se cuplează cu substratul pe care îl va oxida. Concomitent, se produce o schimbare conformaţională a hemproteinei oxidate, cu o conversie de la stare de „spin" scăzut la cea de „spin" înalt;

— *NADPH citocrom-c-reductaza* flavin-enzimă implicată în oxidarea NADPH;

— *NADPH citocrom P-450 reductaza* donor de electroni, care asigură reducerea citocrom P-450 oxidat;

— *Citocrom b_5 şi NADH* (după Estabrook şi Cohen). Se sugerează o cale de reducere asociată cu citocromul b_5, ce poate servi drept al doilea donor de electroni către citocromul P-450.

b) *Fosfatidil-colina* intră în alcătuirea membranei microzomale şi este esenţială pentru transferul de electroni de la NADPH citocrom-c-reductază la citocromul P-450 (1976). Unele studii arată că fosfolipida ar fi necesară pentru legarea substratului la citocromul P-450. Ea pare să joace un rol şi în fenomenul de inducţie a citocromului P-450 prin fenobarbital.

Scanned with OKEN Scanner

Dintre toate aceste componente, citocromul P-450 este elementul principal şi caracteristic metabolizării microzomale a xenobioticelor. Există două forme de citocrom P-450 hepatic, cu specificitate de substrat diferită. Recent (1974) este subliniată formarea unui complex intermediar, substrat „citocrom P-450-oxigen", cu maximum de absorbţie spectrală la 440 nm, care ia e^-

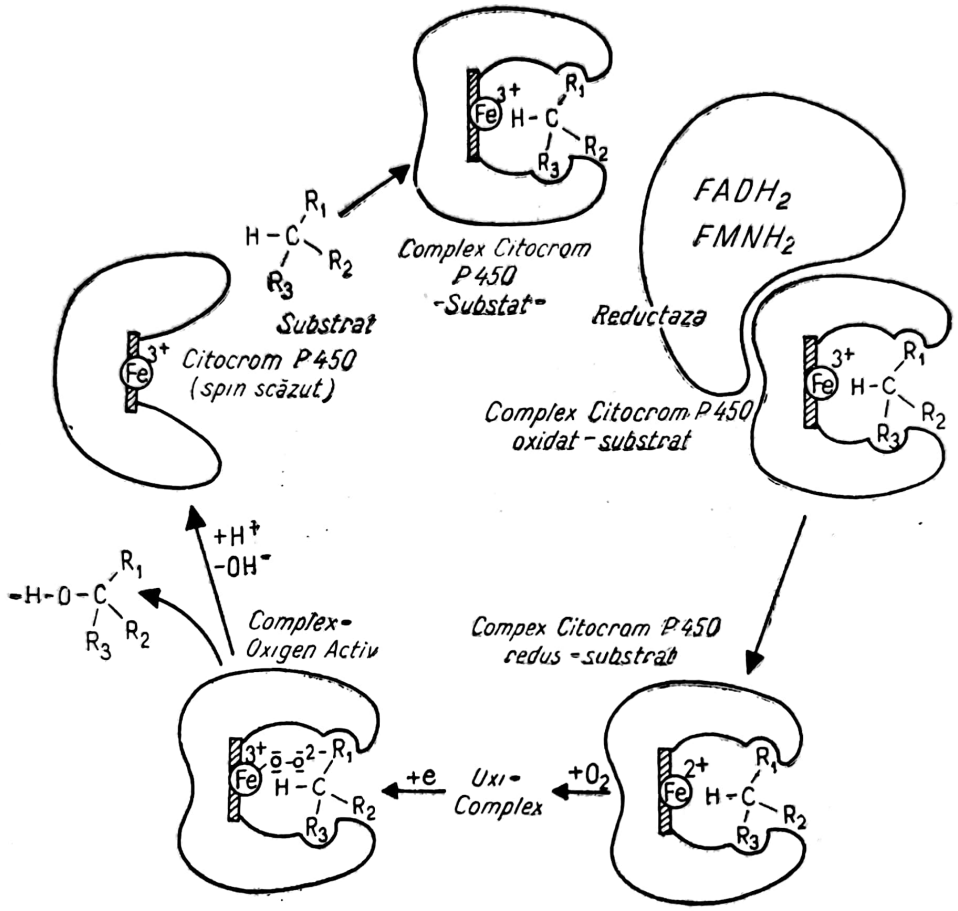


Fig. XVI.11. Ciclul reacţiilor în care activează citocromul P. 450.

de la NADH. Pe baza criteriilor spectrale s-au stabilit două tipuri de medicamente ce reacţionează ca citocromul P-450; tipul I (majoritatea medicamentelor) caracterizat prin modificarea spectrului citocromului P-450; cu un minim la 240 nm şi un maxim la 385 nm; tipul II, cu minimum la 390 nm şi maximum 430 nm (fenazina, anilina, nicotinamida). Ciclul reacţiilor în care activează citocromul P-450, trece prin patru faze: (1) legarea substratului la citocromul P-450 cu schimbarea conformaţională a hemproteinei şi trecerea de la starea de „spin" scăzut, la starea de „spin" înalt; (2) reducerea fierului citocromic prin transfer de e^- de la $NADPH_2$-reductaza; (3) activarea oxigenului cu formarea unui complex oxigen activ, adus la stadiul de peroxid; (4) transferul atomului de oxigen, cu hidroxilarea substratului (fig. XVI.11).

Sistemul de oxidare microzomală realizează o gamă largă de reacţii, bazate pe oxidoreduceri şi hidroliză, finalizate prin hidroxilarea substratului, ce vor fi prezentate mai departe. În cursul acestor reacţii sînt introduse în molecula substanţei metabolizate grupări reactive ca: hidroxil (OH), carboxil (COOH), amino (NH_2), sulfhidril (SH). Aceste grupări permit transformările din faza a doua de sinteză, preponderent reacţiile de conjugare.

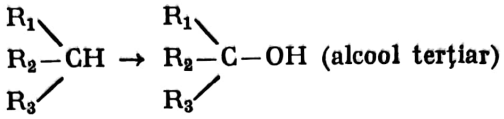
Principalele reacţii enzimatice din faza I sînt:

2.3.1.1. *Oxidări.* Oxidările biologice pot cuprinde o gamă variată de reacţii dintre care foarte multe pot fi încadrate într-un mecanism comun, *hidroxilarea.*

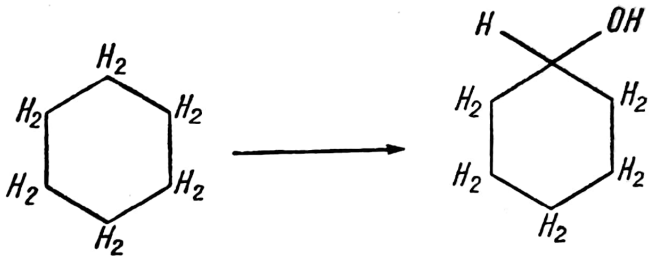
a) *Hidroxilarea alifatică (aciclică sau a lanţului alchil) şi a cicloalcanilor.* Lanţurile alifatice sînt oxidate cu producere de alcool primar, secundar şi terţiar:

$$R-CH_2-CH_3 \longleftrightarrow RCH_2-CH_2-OH \text{ (alcool primar)}$$

$$R-CH_2-CH_3 \longleftrightarrow RCHOH-CH_3 \text{ (alcool secundar)}$$

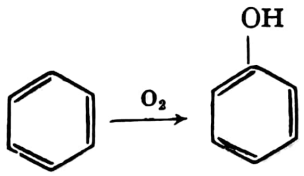


Cicloalcanii generează obişnuit alcooli secundari, ca în reacţia:

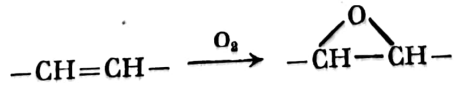


Ulterior se pot produce oxidări ale alcoolilor primari în aldehide şi acizi şi ale alcoolilor secundari în cetone, catalizate de enzimele din fracţiunea solubilă a hepatocitului. Dintre medicamente, barbituraţii sînt obişnuit metabolizaţi prin hidroxilarea lanţului alchil lateral (ex. Nembutalul).

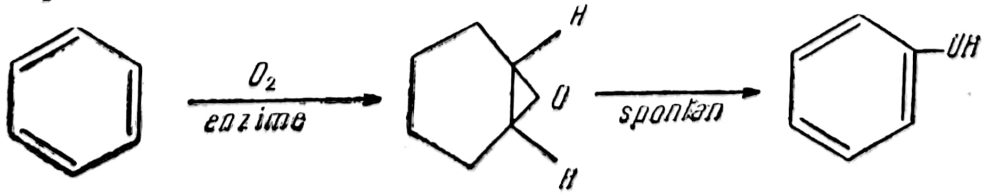
b) *Hidroxilarea aromatică* constă în înlocuirea unui hidrogen de la ciclu aromatic, nesubstituit (de ex. benzenul) sau substituit (amine aromatice) printr-un hidroxil:



Epoxidarea este de asemenea o cale prin care sistemele aromatice pot fi convertite în fenoli. Epoxidarea este o reacţie a dublei legături cu formarea unui ciclu triatomic, foarte reactiv.



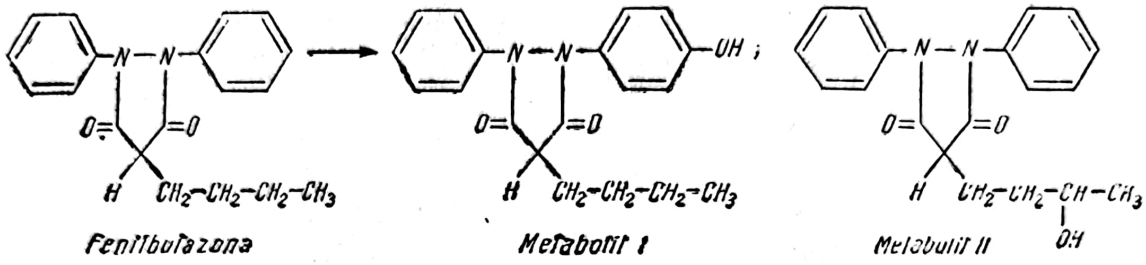
În transformarea benzenului (şi în general a unui ciclu aromatic) în final se poate să apară benzen-epoxidul ca etapă intermediară.



Epoxizii pot fi implicaţi ca metaboliţi intermediari în *carcinogeneza* provocată prin hidrocarburi policiclice. Acţiunea lor s-ar exercita la nivelul macromoleculelor celulare, proteine şi acizi nucleici.

Hidroxilarea aromatică este o cale majoră pentru două medicamente importante, fenobarbital şi fenilbutazona (antiinflamator).

Hidroxilarea mixtă aromatică şi alifatică a lanţului lateral al fenilbutazonei produce doi metaboliţi cu acţiuni diferite. Hidroxilarea ciclului benzenic generează metabolitul I, cu acţiunea antiinflamatoare iar hidroxilarea lanţului lateral, metabolitul II, cu acţiune uricozurică:



c) *O-desalchilarea sau desalchilarea oxidativă* (carbon hidroxilarea). Acesta este mecanismul prin care se îndepărtează gruparea alchil din eteri, cu transformarea în alcooli sau fenoli şi aldehide:

$$RO-CH_3 \rightarrow \underset{\text{produs intermediar neizolat}}{RO-CH_2-OH} \rightarrow R-OH+H-CHO$$

În cazul că R este radical aril, rezultă un fenol.

d) *N-desalchilarea* constă în scoaterea grupului alchil de pe aminele secundare sau terţiare, cu formare de amine — cu un substituent alchil mai puţin — şi de aldehide. Aminele secundare devin astfel primare iar cele terţiare, secundare:

$$\underset{\text{amină secundară}}{R_3-NH-CH_3} \rightarrow \underset{\text{neizolat}}{(R-NH-CH_2+OH)} \rightarrow \underset{\text{amină primară}}{RNH_2}+HCHO$$

Prin acest mecanism se metabolizează analgeticele narcotice, imipramina, aminofenazona (piramidon), dimetilaminofenazona (din care se formează amino-4-antipirina), probenecidul, clorpromazina.

e) *N-oxidarea* este mecanismul prin care aminele primare şi secundare sînt oxidate, cu producere de hidroxilamine iar cele terţiare sînt transformate în N-oxizi, conform ecuaţiilor:

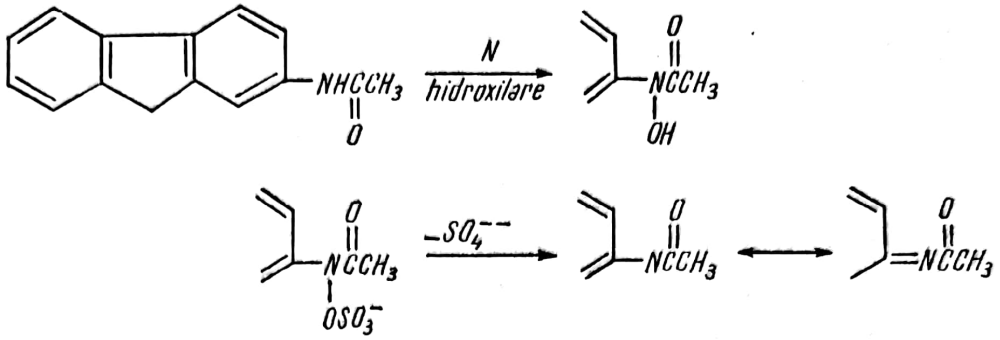
$$RNH_2 \rightarrow RNHOH$$

$$R_1R_2NH \rightarrow R_1R_2NOH$$

$$R_1R_2R_3N \rightarrow R_1R_2R_3-NO$$

Hidroxilările pot fi toxice şi în unele cazuri cancerigene ca în cazul N-hidroxi-2 acetamino-florenului (AAF). Agentul carcinogen este metabolitul electrofil (deficitar în electroni) ce rezultă din AAF prin N-hidroxilare, urmată de este-

rificare cu hidroxisulfat şi apoi de pierderea sulfatului. S-ar părea că mecanismul este cel de mai jos:



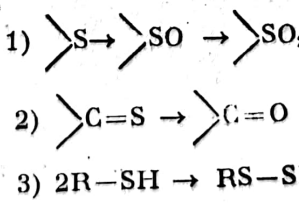
Substanţă cancerigenă
↙ electrofilă
Celule cu AAF (2-acetaminofluoren) legat de acizi nucleici, proteine.
↓
↓(?)
NEOPLASM

Se presupune că aceasta este o condiţie a carcinogenezei chimice, ca substanţa activă sau metabolitul care rezultă din transformarea microzomală să fie un reactant puternic electrofil.

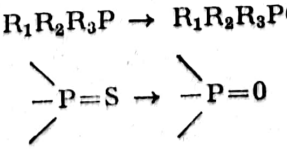
Aminele aromatice au ca efect toxic important formarea methemoglobinei. Agentul methemoglobinoformator din eritrocite este rezultat din N-hidroxilarea aminei aromatice respective. În general, aminele aromatice şi cele nitroaromatice cît şi derivaţii lor care sînt foarte întrebuinţate în industria chimică, în tehnică şi medicamente, se metabolizează pe această cale. Din aminele terţiare, folosite ca medicamente, se metabolizează astfel *dimetilamfetamina* şi *guanetidina*, oxizii lor de N fiind eliminaţi ca metaboliţi urinari.

f) *Dezaminarea oxidativă* are ca rezultat formarea de aldehide sau cetone şi amoniac. Oxidazele microzomale pot dezamina oxidativ o serie de substanţe care nu sînt transformate prin MAO. Acest din urmă sistem dezaminează numai aminele endogene şi medicamentele sau metaboliţii lor, cu structuri asemănătoare cu acestea.

g) *alte forme de oxidare.* Printre acestea se pot include: oxidarea atomilor de S (din sulfuri) în sulfoxizi şi sulfinele respective, înlocuirea S cu O, oxidarea SH cu formare de legături disulfurice. Aceste reacţii pot fi reprezentate astfel:



Reacţii similare pot avea loc cu unii compuşi fosforici, ca de pildă oxidarea fosfinelor şi conversiunea triozofosfaţilor (paration) în fosfaţi:



h) *Oxidarea alcoolilor*. La mamifere alcool-dehidrogenaza (NADH dependentă) — enzimă citosolică — catalizează oxidarea alcoolilor (etanol, butanol, ciclohexanol, alcool benzilic etc.). Sistemul oxidazic microzomal intervine atît în oxidarea alcoolului etilic cît şi în oxidarea unor medicamente. Sistemul este denumit MEOS*.

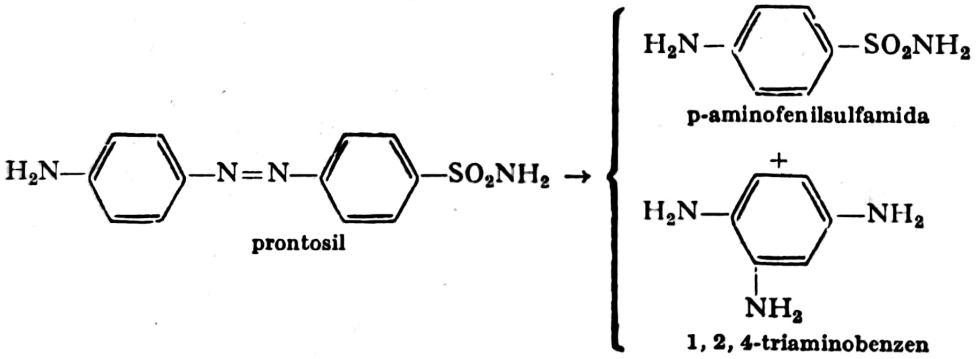
Medicamente inductoare ale OFMM ca fenolbarbitalul determină şi creşterea MEOS. O literatură bogată aduce date asupra interacţiunii dintre alcooli şi diferite medicamente. In vivo 80% din alcool este oxidat prin aldehid dehidrogenaza (ADH), iar 20% prin MEOS; administrarea cronică de alcool măreşte activitatea MEOS. OFMM poate executa la diferite specii animale o serie de reacţii diverse ca: ʊ-oxidarea acizilor graşi sau a altor compuşi (ca acetofenona), dehidrogenări, transpoziţii moleculare, demetilare etc.

2.3.1.2. *Reduceri*. Sînt mai bine studiate reducerile microzomale ale nitro- şi azo- derivaţilor, compuşi utilizaţi în industrie şi ca medicamente. Reacţiile se petrec conform unor ecuaţii de tipul:

$$\text{a)}\ \underset{\text{nitro derivat}}{RNO_2} \rightarrow \underset{\text{nitrozo-derivat}}{RNO} \rightarrow \underset{\text{hidroxil-amină}}{RNHOH} \rightarrow \underset{\text{amină}}{RNH_2}$$

$$\text{b)}\ \underset{\text{azoderivat}}{R_1N{=}NR_2} \rightarrow \underset{\text{hidroazoderivat}}{R_1NHNHR_2} \rightarrow \underset{\text{amine}}{R_1NH_2 + R_2NH_2}$$

Exemplul cel mai bine cunoscut în farmacologia biochimică este reducerea prontosilului şi Neoprontozilul la sulfamida antibacteriană activă:



Scindarea reductivă a prontosilului roşu inactiv în sulfamidă activă.

c) Reducerea cetonelor la alcooli secundari:

$$R_1R_2CO \rightarrow R_1R_2CHOB$$

d) Reducerea aldehidelor la alcooli primari: $RCHO \rightarrow RCH_2OH$

e) Reducerea dublelor legături $=R_1CH{=}CHR_2 \rightarrow R_1CH_2{-}CH_2R_2$;

f) Reducerea arsenicalelor pentavalente la arsenicale trivalente:

$$RASO(OH)_2 \rightarrow RASO$$

g) Reducerea legăturii disulfidice la tioli:

$$R_1S \cdot SR_2 \rightarrow R_1SH + R_2SH$$

h) Reducerea N-oxizilor: $\diagdown\!\!-NO \rightarrow N\!\!-\!\!\diagup$

Pentru substanţele administrate oral, reducerile pot fi efectuate atît de flora intestinală, cît şi prin sistemul OFMM.

---

* MEOS = sistemul microzomal de oxidare al alcoolului etilic (C_2H_5OH).

Scanned with OKEN Scanner

2.3.1.3. *Hidroliza.* Reacţiile privesc în special compuşii de tip ester sau amidă. Numeroase medicamente ce conţin aceste legături sînt scindate prin enzime biochimice din plasmă şi ţesuturi, iar altele prin enzime „xenobiotice" din ficat. Ele privesc substanţe ca =: alcooli, fenoli, acizi carboxilici. La numeroase specii hidroliza are loc nu numai în ficat ci mai ales în plasmă care conţine esterazele capabile să scindeze medicamentul. Pot avea loc următoarele tipuri de reacţii:

$$\underset{\text{ester organic}}{R_1OCOR_2} \rightarrow R_1OH + R_2COOH$$

$$\underset{\text{ester fosforic}}{ROPO(OH)_2} \rightarrow ROH + PO(OH)_3$$

Hidroliza esterilor fosforici poate include bi- şi tri- esteri ca în cazul pesticidelor organo-fosforice.

Hidroliza anumitor amide, se produce astfel:

$$\underset{\text{amidă primară}}{RCONH_2} \rightarrow RCOOH + NH_3$$

$$\underset{\text{amidă secundară}}{RNHCOCH_3} \rightarrow RNH_2 + CH_3-COOH$$

2.3.2. FAZA A II-a: MECANISMUL GENERAL AL CONJUGĂRII

Deoarece conjugările sînt reacţii de sinteză endergonice, realizarea lor se face cu folosirea ATP-ului ca sursă de energie. Aceste reacţii sînt caracterizate prin formarea unui compus intermediar activ (în majoritatea cazurilor un nucleotid) şi prin acţiunea unei enzime de transfer ce catalizează treapta finală, între intermediarul activ şi produsul de conjugare. Ca urmare, există două feluri de reacţii de conjugare, după cum este activat agentul de conjugare sau compusul străin:

a) Agent de conjugare $\xrightarrow{\text{energie}}$ agent de conjugare activat

\+ compus străin (medicament) $\xrightarrow{\text{transferază}}$ compus străin conjugat.

b) Compus străin (medicament) $\xrightarrow{\text{energie}}$ compus străin activat + agent de conjugare $\xrightarrow{\text{transferază}}$ compus străin conjugat.

La om sînt cunoscute opt tipuri majore de reacţii de conjugare ce utilizează ca agenţi conjugaţi metaboliţi ternari (hidraţi de carbon, acid glucuronic, radical acetil), metaboliţi azotaţi (aminoacizi ca: glicina, cisteina, glutamina şi metionina), metaboliţi sulfurici (sulfaţi, sulfuri). Spre deosebire de reacţiile fazei I, care nu sînt legate de specie, cele din faza a II-a sînt filogenetic diferite; pe treptele evolutiv inferioare se foloseşte conjugarea cu oze şi formarea de ozide, în timp ce omul şi vertebratele superioare fac conjugările cu acid glucuronic. Conjugarea cu glicocol o foloseşte numai omul şi animalele terestre iar glutamina intră în conjugare numai la om şi cimpanzeu. Atît enzimele fazei I cît şi acelea ale fazei a II-a de metabolizare sînt localizate în membrana microzomală, principala enzimă de conjugare (la om), glucuro-

niltransferaza fiind localizată pe faţa internă a membranei microzomale. Aranjamentul lor în membrană este redat după Estabrook şi col. în fig. XVI.12. Rappaport prezintă un model de asamblare a enzimelor de detoxi-

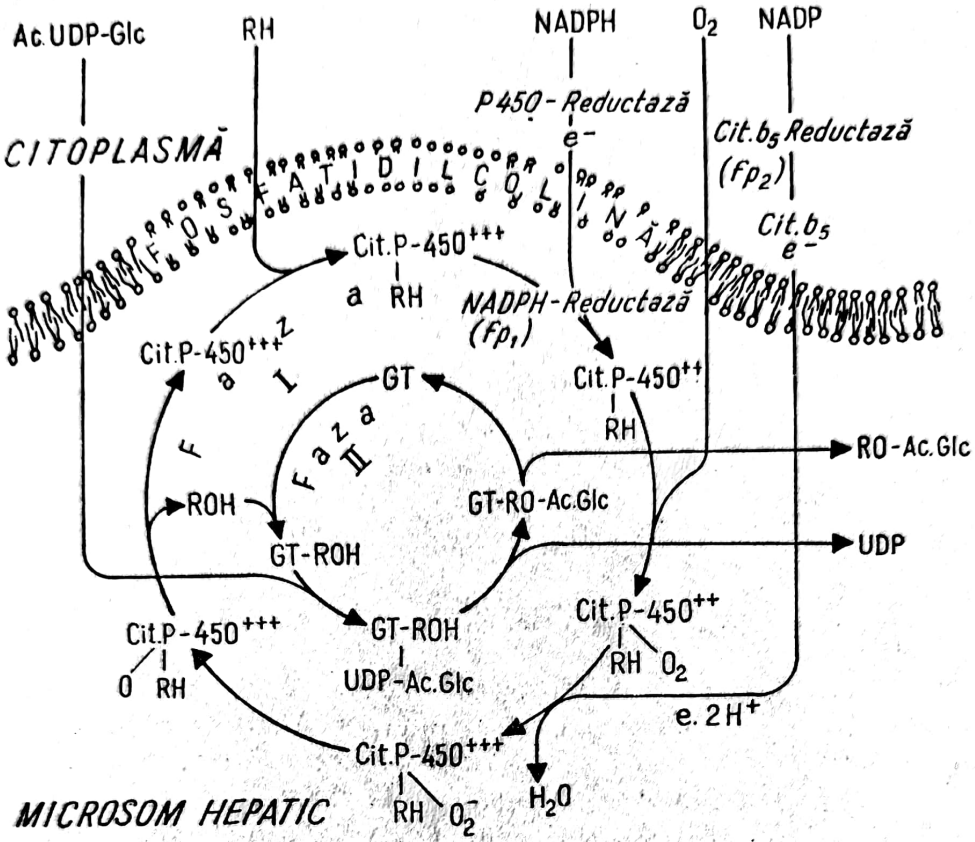


Fig. XVI.12. Aranjamentul membranar al enzimelor active în fazele 1 şi 2 ale biotransformării, după Estabrook şi col.

fiere din membrana microsomală hepatică, în concepţia membranei ca mozaic mobil-Singer.

În faza a II-a mecanismul general al conjugării include conjugarea cu agenţii indicaţi în tabelul XVI.3. Reacţia de conjugare poate determina detoxifierea substanţei străine fără sau cu pierderea activităţii biologice (hidrocortizon). În unele cazuri prin conjugare se realizează o bioactivare a medicamentului (6-mercaptopurina).

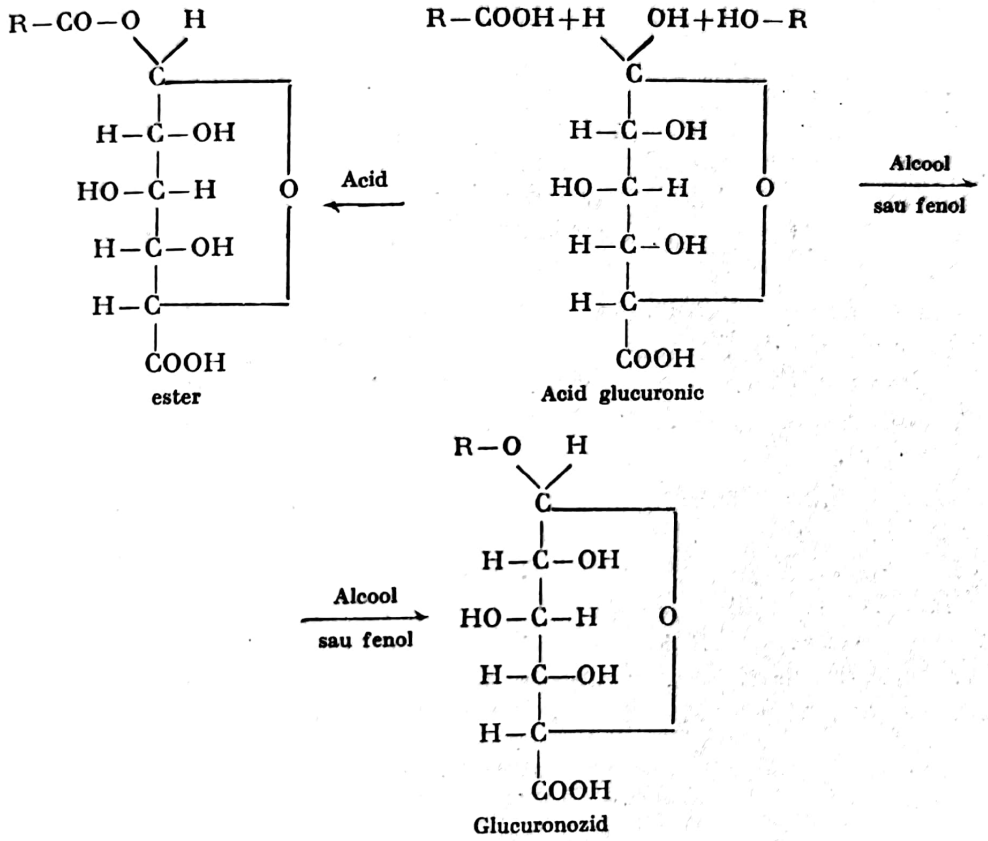
Tabelul XVI.3

Mecanisme şi agenţi de conjugare în ficat

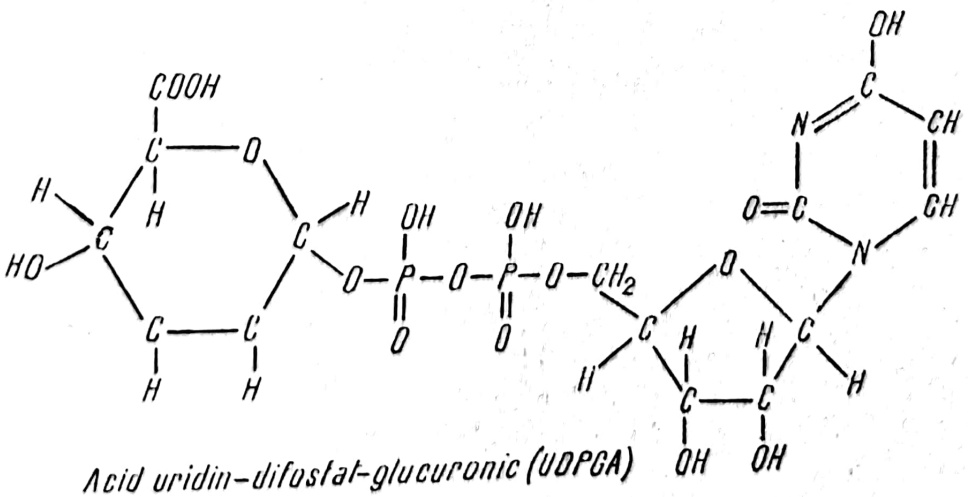
Agentul de conjugare	Transportor	Substrat caracteristic
Glicina	CoA	Acizi aromatici
(Ornitina)		—
Glutamina		—
Acetil	CoA	Grupări amino
Acid glucuronic	UDP-glucuronat	Alcool, fenol, steroide, acizi aromatici, bilirubină
Cisteina	GSH	Compuşi aromatici
Metil	Adenozilmetionina	Nuclei piridinici
		O-catecolamine
Sulfat	Sulfat activ	Fenol şi alte steroide

2.3.2.1. *Glucurono-conjugarea* reprezintă calea majoră de detoxifiere realizată în faza finală de transformare a metaboliților endo- și exogeni ca: bilirubina, hormonii (steroizi, tiroidieni), acizi organici cu lanț lung de atomi de carbon sau aromatici, fenolii, tiocompuși, amine primare, hidroxilamine etc. Legătura se stabilește între oxidrilul semiacetalic al acidului glucuronic și un OH alcoolic sau fenolic al substanței străine cu formare de legătură ozidică (morfina, acetaminofenul, fenacetina) sau cu un oxidril, formîndu-se un ester (aspirina, acidul salicilic, acidul nicotinic, probenecidul).

În toate cazurile gruparea activă a acidului glucuronic este grupul hidroxi-carbon$_1$.



Sistemul care catalizează glucuronoconjugarea implică formarea acidului uridindifosfoglucuronic=AUDPG (UDPGA):



Acid uridin-difosfat-glucuronic (UDPGA)

Secvenţa reacţiilor ce asigură procesul de formare a acestuia şi conjugarea substanţei hidroxilate este:

1. glucozo −1 fosfat (ester Cori) + UTP → UDPG + PP (uridin difosfat glucoză)

2. $UDPG + 2\,NAD^{+} \xrightarrow{\text{UDPG-DH}} UDPGA + 2\,NADH$

3. $UDPGA + 3\,XH \xrightarrow{\text{UDPGA transferază}} RXGA + UDP$ (R-glucuronat)

X poate să fie: O, CO. NH sau S.

În cursul acestor reacţii trebuie să se efectueze şi o inversiune prin care legătura glucuronozidică de tip α trece în tipul β al conjugatului, ce este hidrolizabil prin β-glucuronidază. În ficat glucuronoconjugarea poate să scadă prin acţiunea pirofosfatazei microzomale care hidrolizează UDPGA la acidul 1-P-glucuronic şi prin β-glucuronidază (lisozomală) care hidrolizează O-glucuronaţii.

Deoarece fenolii şi sterolii formează glucuronaţii de tip eter iar bilirubina şi acidul antranilic de tip ester, se sugerează existenţa a cel puţin două forme de UDP-glucuroniltransferază microsomală hepatică. Se acceptă de asemenea existenţa unor enzime diferite pentru O- şi respectiv N-glucuronidare (cu variate amine).

2.3.2.2. *Sulfoconjugarea* este o cale importantă de metabolizare a alcoolilor alifatici, fenolilor şi sterolilor cu formare de esteri sulfurici, prezentă la mamifere, păsări, reptile şi amfibii. La mamifere şi păsări „sulfatul activ" transformă aminele aromatice în sulfamaţi, în prezenţa unor transferaze. Reacţia se petrece în citosolul hepatic cu participarea ATP-ului, care activează sulfatul la adenozin-5′-P-sulfat (APS) şi apoi la 3′-P-adenozin-5-P-sulfat (PAPS). Secvenţa reacţiilor ce au loc în acest proces este:

$$ATP + SO_4^{2-} \xrightarrow[Mg^{++}]{\text{ATP-sulfurază}} APS + PP$$

(adenozin 5′-fosfosulfat)

$$APS + ADP \xrightarrow{\text{APS-kinază}} PAPS + ADP$$

(3′-P-adenozin-5-P-sulfat)

$$PAPS + \text{fenol} \xrightarrow{\text{sulfokinază}} \text{fenilsulfat} + PAP$$

(acid 3′- fosfoadenilic)

2.3.2.3. *Conjugarea cu aminoacizi*. La om doi aminoacizi sînt folosiţi, în special, pentru acest mecanism: glicina şi glutamina. Cisteina acetilată realizează, la om, conjugarea mercapturică în mult mai mică măsură decît primele două reacţii.

Conjugarea cu glicocolul (cunoscută din 1842, W. Keller) este utilizată pentru conjugarea a numeroşi acizi aromatici (tip acid benzoic) şi heterociclici (acid nicotinic), a derivaţilor carboxilici ai tiofenului, ai furanului sau a acizilor cu lanţ lung de atomi de carbon, nucleu aromatic şi duble legături (acid cinamic).

Scanned with OKEN Scanner

Reacţia se petrece în prezenţa de ATP şi de CoA, mecanismul desfăşurîndu-se cu următoarea secvenţă de reacţii în cazul conjugării acidului benzoic:

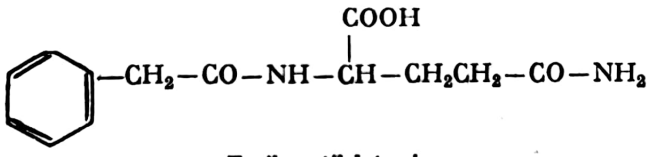
$$ATP + CoASH \rightarrow AMP + CoA - S\text{-pirofosfat}$$

$$CoAS\text{-pirofosfat} + \text{acid benzoic} \rightarrow \text{benzonil-S-CoA} + \text{pirofosfat}$$

$$\text{benzoil-S-CoA} + \text{glicocol} \rightarrow \text{acid hipuric} + CoA\ SH.$$

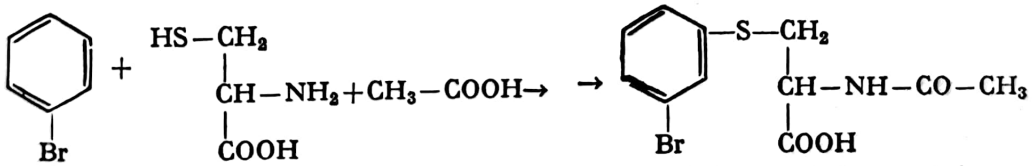
Conjugarea acidului benzoic cu glicocolul, cu formare de acid hipuric, se face principal în rinichi şi accesoriu în ficat. Dar glicocolul folosit în reacţie este de origine preponderent hepatică, hepatocitul avînd posibilitatea de a produce o cantitate importantă din acest aminoacid. Pentru acest motiv, eliminarea urinară de acid hipuric după administrare de acid benzoic a constituit o probă de explorare hepatică (Quick).

Conjugarea cu glutamină se petrece la om cu formarea unei legături amidice între grupul NH_2 al aminoacizilor şi grupul carboxil al drogului. Ca tip de reacţie poate fi luată conjugarea acidului fenil acetic cu glutamina, cu formare de fenil-acetilglutamină:



Fenil acetilglutamina

Conjugarea mercapturică se referă la diferite hidrocarburi aromatice, monohalogenate, care se elimină în urină, combinate cu cisteina, formînd un acid mercapturic. În urina normală există acizii mercapturici în cantitate mică (sulf neutru):



Acid bromofenilmercapturic

Conjugarea mercapturică

2.3.2.4. *Acilarea.* În forma cea mai comună, acilarea se realizează cu acidul acetic*. Pentru acetilare sînt necesare enzimele denumite *transacilaze*, prezente în ficat. În desfăşurarea procesului este nevoie de: piruvat, decarboxilaza piruvică, pirofosfat de tiamină, acid lipoic, CoA, ioni de Mg^{++} şi NAD^+. Mecanismul acetilării este folosit în conjugarea compuşilor cu grupări NH_2 şi NH^-. Cele mai importante reacţii de detoxifiere, pe această cale, privesc sulfamidele.

Reacţia generală de acilare poate fi reprezentată astfel:

$$CH_3 - CoA + XNH_2 \xrightarrow{\text{transacilază}} XNHCOOH_3 + CoASH$$

* Agentul conjugant activ este acetil CoA care este produs fie pe cale glicolitică anaerobă, cu transformarea acidului piruvic prin piruvat-decarboxilază, fie prin β-oxidarea acizilor graşi sau prin aminoacizi.

Scanned with OKEN Scanner

în care X poate fi: radical alifatic, un inel aromatic, radical provenind din α-aminoacizi, hidrazine şi hidrazide ($RNHNH_2$ şi $RCONHNH_2$), o grupare sulfonamidică (SO_2-NH_2).

2.3.2.5. *Metilarea* se produce cu substanţe care conţin sau cîştigă în faza I a biotransformării, grupări OH, SH, NH_2. Forma de activare a metilului este S-adenozil-metionina, secvenţa reacţiilor fiind:

$$\text{metionină} + \text{ATP} + \text{E} \rightarrow \text{S-adenozil-metionină-E-P-P-P-}$$

$$\text{S-adenozil-metionină-E-P-P-P-} \rightarrow \text{S-adenozil-metionină-E-P-P} + P_i;$$

$$\text{S-adenozil-metionină-E-P-P-} \rightarrow \text{S-adenozil-metionină} + \text{E-P} + P_i.$$

În acest sistem de reacţii E este o enzimă din citosol. Transferul grupării metil de pe S-adenozilmetionină pe substanţa receptoare se face prin intervenţia unei metiltransferaze, relativ specifice. Metilarea este o cale de mai mică importanţă pentru transformarea medicamentelor. Intervine în trecerea normorfinei în morfină (prin metil transferaze hepatice nespecifice). Este importantă pentru compuşii endogeni (acid nicotinic, noradrenalină).

Formarea tiocianatului (sulfocianură) este o cale de transformare a acidului cianhidric, nitrililor şi carbilaminelor alifatice prin acţiunea rodanazei hepatice (în prezenţa sulfului coloidal sau a unui tiosulfat sau tiosulfat organic). În mod normal se găseşte în salivă sulfocianat de amoniu şi în urină mici cantităţi de sulfocianat alcalin.

În cazul detoxifierii diferitelor medicamente trebuie subliniat faptul de importanţă capitală pentru chimioterapie, că biotransformarea acestor substanţe este „adaptabilă".

2.3.3. INDUCŢIA ENZIMATICĂ MICROZOMALĂ

Nivelul de metabolizare al medicamentelor poate fi scăzut sau inhibat complet, printr-o serie de compuşi ce pot acţiona direct asupra OFMM sau extra OFMM hepatic. Activitatea unor medicamente poate fi prelungită sau crescută prin administrarea simultană a altor compuşi (fie el alt medicament), care funcţionează ca „potenţiator" sau prin mărirea sensibilităţii receptorilor celulari faţă de primul medicament. Foarte important este de asemenea fenomenul de „inducţie enzimatică microzomală" prin factori alimentari, substanţe străine şi mai ales medicamente dintre care unele au structuri şi activităţi farmacologice variate ce pot exercita acest efect. Cele mai studiate medicamente capabile să producă inducţie enzimatică microzomală sînt barbituricile în special fenobarbitalul. Tratamentul cu fenobarbital, ca inductor al glucuronil transferazei se aplică în icterul provocat prin deficienţa acestei enzime. În mecanismul de producere a efectului de inducţie este implicată creşterea nivelului citocromului P-450, a enzimelor de detoxifiere în procesul de activare directă a permeabilităţii microzomale, blocarea efectului unor inhibitori. Se presupune că mecanismul intim de stimulare a acestor enzime are la bază, de fapt, creşterea biosintezei enzim proteinelor, implicate în metabolizarea medicamentelor.

2.4. PATOLOGIA BIOCHIMICĂ A FICATULUI

Patologia biochimică a ficatului poate fi dobîndită sau înnăscută. Prima este centrată de sindromul icter, iar a doua de variate deficienţe enzimatice care au fost prezentate în capitolele de metabolism (IX, X, XI).

Scanned with OKEN Scanner

Icterul (gălbenarea) este sindromul care se produce prin creşterea concentraţiei bilirubinei serice, peste 2 mg%, nivel la care pigmentul trece în ţesuturi. Icterul este expresia fie a unei producţii crescute de pigmenţi biliari care depăşeşte capacitatea de excreţie a ficatului sănătos, fie a unei leziuni hepato-celulare (toxică sau infecţioasă), fie a unui obstacol (intra- sau extra-

Tabelul XVI.4

Clasificare patogenică a tipurilor de icter

Tipul de icter	Bilirubină serică	Sindrom sau boală
Prehepatic	Neconjugată (indirectă)	Stări hemolitice Icterul noului născut
Hepatic — premicrozomal	Neconjugată (indirectă)	Sindrom Gilbert Crigler-Najjar
Hepatic — hepatocelular	Conjugată (directă)	Hepatită, ciroză
Hepatic — postmicrozomal	Conjugată (directă)	Sindrom Dubin-Jonhson, Rotor, medicamente
Hepatic — Colestază		
Posthepatic	Conjugată (directă)	Ciroză biliară, litiază biliară, Cancer cap de pancreas etc.

(după Noel F. Mac Lagan

hepatic) în curgerea bilei. Prin obstacol extrahepatic se realizează icterul posthepatic. În tabelul XVI.4 este redată o clasificare patogenică a tipurilor de icter (1970).

Autorul subliniază dificultatea de încadrare a colestazei, în clasificare. Schimbările biochimice se aseamănă cu cele ale icterului posthepatic, dar fosfataza alcalină serică nu este prea ridicată. În cele ce urmează se mai fac unele precizări în legătură cu acest tabel. *Icterul hepatocelular* poate fi de cauză infecţioasă, virală (antigenul HBs) sau de cauză toxică. *Sindromul Gilbert* sau hiperbilirubinemia familială (icterul juvenil, intermitent al lui Meulengracht) se pare că se produce printr-un deficit al proteinei transportoare ce determină deficitul de prelucrare a bilirubinei indirecte de către hepatocit, ea rămînînd astfel neconjugată. *Icterul neonatal* sau boala hemolitică a noilor născuţi, este parţial de origine hepatică şi provocat de capacitatea restrînsă a ficatului de a excreta bilirubina în bilă.

Sindromul Crigler-Najjar este provocat de absenţa congenitală a UDP-glucuronil-transferazei. *Sindroamele icterice Dubin-Johnson* (cu o depozitare de pigment închis la culoare, în ficat) şi Rotor (fără depozitare de pigment în ficat) par datorate unui deficit al mecanismului de transport în interiorul hepatocitelor. *Sindromul Arias* sau icterul de lungă durată al noilor născuţi, a fost corelat cu prezenţa în laptele matern a unui steroid (pregnandiol) care s-a dovedit experimental că este un inhibitor al conjugării bilirubinei.

Acumularea de bilirubină neconjugată (în incompatibilitatea de factor Rh) are efecte importante asupra procesului care conduce la icterul nuclear.

În general, s-ar părea că bilirubina indirectă este toxică şi conjugarea sa în ficat corespunde unui veritabil proces de detoxifiere.

Scanned with OKEN Scanner

Principalele boli determinate prin deficite enzimatice înnăscute au fost descrise în capitolele respective de metabolism. Din tulburările metabolice înnăscute ale aminoacizilor (descrise la capitolul XI) se menţionează aici, aminoaciduria din cadrul unui sindrom cu deosebită importanţă clinică. Este vorba de *degenerescenţa hepato-lenticulară* sau boala lui Wilson, deter-

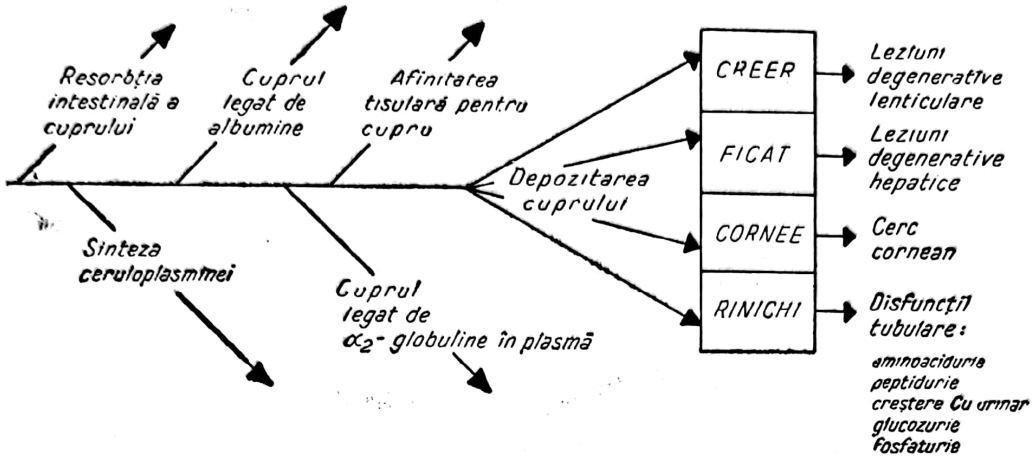


Fig. XVI.13. Corelaţii metabolice şi sindromul clinic din degenerescenţa hepato-lenticulară.

minată cu multă probabilitate de un deficit de biosinteză a ceruloplasminei (schemă, fig. XVI.13). Această oxidază (fero sau cupro-oxidază) are un nivel foarte scăzut în boala menţionată. Leziunea biochimică are consecinţe metabolice şi clinice cunoscute: leziuni cerebrale (lenticulare), leziuni corneene, leziuni renale, aminoacidurie, fosfaturie depozitare de cupru în ţesuturi.

2.5. EXPLORĂRI FUNCŢIONALE HEPATICE SISTEMATIZ ATE

Sistematizarea explorărilor hepatice, are la bază exisetnţa celor patru sindroame întîlnite în patologia hepatică: *excreto-biliar*, *hepato-priv* (sau de insuficienţă celulară), de citoliză şi cel *inflamator*.

Pentru explorarea sindromului excreto-biliar se determină în sînge bilirubina totală, directă şi indirectă, raportul dintre cele două forme dînd indicaţii asupra patogeniei icterului (vezi tabel), prehepatic, hepatic (leziune hepatocelulară infecţioasă sau toxică), prin deficit de conjugare a bilirubinei, principalele posibilităţi de reacţie fiind sintetizate în tabelul XIV.4 (şi Capitolul XIX).

Prin sindromul *hepato-priv* sînt investigate proteinemia totală, albumina serică, factorii de coagulare, colesterolul liber total şi esterificat (mai puţin intrat în practica obişnuită). Dintre diferitele probe de conjugare (ex. proba Quick cu acid benzoic) şi de clearance (BSP., Rose-Bengale). Investigaţiile se execută azi numai cu proba BSP (bromsulfonftaleină).

Pentru investigarea sindromului de citoliză se determină: sideremia, cupremia şi enzimele plasmatice cu valoare diagnostică. Dintre acestea din urmă sînt socotite organospecifice: SDH, OCT, arginaza, fructozo-1-fosfat-aldolaza, urocanaza şi guanaza (după experienţa mai restrînsă şi mai recentă a unor autori), GLDH (indicatori de leziune mitocondrială hepatică) şi izoenzima LDH-5, folosită atît în diagnostic, cît şi ca indicator de severitate

Scanned with OKEN Scanner

a leziunilor. La acestea se adaugă enzimele caracteristice leziunii hepatice; GPT, GOT cu raportul

$$\frac{GOT}{GPT} \text{ și raportul } \frac{GOT+GPT}{GLDH} \text{ (raport Schmidt)}$$

Pentru explorarea sindromului *excreto-biliar* alături de determinările de bilirubină și urobilinogen se explorează enzimele care exprimă componenta obstructivă: fosfataza alcalină (cu izoenzimele sale) LAP, 5′-nucleotidaza și gama GT (ambele foarte utile) deoarece nu înregistrează creșteri de origine osoasă*.

Pentru explorarea sindromului *inflamator* se explorează în special testele de disproteinemie și electroforeza proteinelor plasmatice, înregistrîndu-se scăderi ale fracțiunii albuminice și creșteri ale β- și γ- globulinelor. Imunelectroforetic se pune în evidență o creștere a IgM în procesele acute, în special și a IgA în procesele cronice.

Redăm în tabelul XVI.5 un program al investigațiilor enzimatice ce se practică în prezent în hepatopatii.

Tabelul XVI.5

Teste enzimatice cu aplicare în patologia hepatică

1. *GOT*
2. *GPT*
3. Raportul $\frac{GOT}{GPT_1}$ (=1,33, la normal, după De Ritis)
4. Fosfataza alcalină (eventual cu izoenzimele sale caracterizate prin inhibiție diferențială, termică sau chimică).
5. LDH totală (eventual cu zimograma și calculul raportului H/M, =1—3 în serul normal).
6. LDH_5 (prin profilare izoenzimatică obținută prin: inhibiție diferențială termică sau chimică sau prin absorbție selectivă pe DEAE celuloză).
7. Pseudoclinesteraza
8. OCT (ornitincarbamil-transferaza)
9. Fructozo-1-fosfataldolaza (eventual cu raportul *fructozo-1-6-difosfat-aldolaza*/5-fructozo-1-fosfat-aldolaza-12, în serul normal).
10. Sorbitol-dehidrogenaza
11. Guanaza
12. GLDH (glutamatdehidrogenaza)
13. Raportul $\frac{GOT+GTP}{GLDH}$ { 5—15, în icterul obstructiv; 30—50, în hepatopatii cronice; 50, în hepatita acută
14. LAP (leucinaminopeptidaza
15. γ-GT (γ-glutamiltranspeptidaza)
16. 5′-nucleotidaza

Se precizează că investigațiile enzimatice indicate în pozițiile:
- de la 1—4 reprezintă programul minimal, curent aplicat;
- de la 5—13 program superior, deschis progresului tehnicometodologic;
- de la 14—16 program necesar precizării diagnosticului de icter obstructiv.

Explorarea directă a ficatului se face prin puncție-biopsie — din ce în ce mai practicată — și prin gamascintigrafie cu determinarea clearance-lui colorantului Rose-Bengale (tetracloro-tetraiodo-fluoresceină marcată cu I-131). Puncția biopsie poate asocia explorarea morfologică cu cea biochimică dacă se folosesc ultramicrometode cantitative.

* Valoare diagnostică asemănătoare are și dozarea de AAP=alaninaminopeptidază (Haschen).

Scanned with OKEN Scanner

Capitolul XVII

BIOCHIMIA ŢESUTULUI MUSCULAR

Mușchiul este un transformator energetic chemo-mecanic, țesut al conversiunii energiei acumulate în ATP în energia mecanică a contractilității și motilității. Ca esență funcțională, el face parte din categoria de formațiuni biologice, apărute prin diferențiere celulară evolutivă, specializate în contractilitate*, proprietate generală a protoplasmei originare. Filamentele contractile sînt microtubuli alcătuiți principal din proteine denumite tubuline, prezenți în majoritatea celulelor eucariotice participînd la toate activitățile ce implică tensiune mecanică, torsiune sau translocație. Prin aceste formațiuni se asigură activitatea propulsivă a cililor și flangelelor și tot ele intervin în organizarea conținutului celular, formația „fusului" în diviziunea celulară, deplasarea cromozomilor, a organitelor și a particulelor, în transportul materialelor intracelulare (pigmenți ca melanina în melanocite) etc. La vertebrate contractilitatea rămîne apanajul celulelor musculare (miocite), însușire care subordonează toate celelalte trăsături funcționale.

Pentru organismul întreg și pentru membrele sale, musculatura joacă rol capital în menținerea posturii, stabilitate și mers, ca și în respirație, circulația sîngelui prin arborele vascular, mișcările tractului digestiv etc.

Mecanismul contracției musculare este unul din cele mai evidente exemple de integrare complexă a unităților de organizare moleculară și a celor supramoleculare — celule și ultrastructuri celulare — într-un impresionant ansamblu de structură morfo-funcțională. Integrarea datelor de microscopie optică, în contrast de fază și electronică, a diagramelor de difracție cu raze X, sub diferite incidențe, înainte și după extracția selectivă a proteinelor miofibrilare, au condus la cuplarea datelor metabolice cu cele morfologice, cristalizate în principalele concepții asupra contracției musculare.

În pofida numeroaselor cunoștințe acumulate, problema fundamentală a biologiei mușchiului — *modul în care se face transferul de energie de la ATP la miozină* — rămîne încă nerezolvată. Pentru înțelegerea datelor ce privesc cuplarea fenomenelor biologice cu cele mecanice în contracția musculară, sînt încă necesare numeroase studii asupra caracterelor structurale și ultrastructurale ale unității morfo-funcționale din acest țesut.

* Contractilitate = schimbare activă a formei unui element celular producîndu-se sub influența unei excitații adecvate. Celulele vii posedă diferite grade de contractilitate.

Scanned with OKEN Scanner

1. CLASIFICAREA MUŞCHILOR. TIPURI MORFO-FUNCŢIONALE

Celulele sau fibrele musculare se asociază în grupuri de aceeaşi natură, îmbinîndu-se cu elemente conjunctive, vasculare, nervoase. Ele alcătuiesc astfel: organe individualizate — *muşchii scheletici*, sau participă la conformaţia diferitelor organe — *musculatura netedă viscerală*. Se cunosc trei categorii de ţesut muscular, fiecare avînd caractere morfologice, funcţionale şi origine embrionară diferite (epitelială sau mezenchimatoasă).

1.1. MUŞCHII STRIAŢI SAU SCHELETICI

Sînt muşchii ale căror fibre se contractă voluntar, scurt şi rapid. Aceştia se subîmpart în muşchi roşii şi muşchi albi, după preponderenţa fibrelor roşii, bogate în mioglobină şi în reticul sacro-plasmatic, posedînd un aport mitocondrial puternic şi o intensă activitate oxidativă pe calea ciclului Krebs. Fibrele albe au rezerve mici de mioglobină, fascicule miofibrilare strînse şi abundente, număr redus de mitocondrii; în schimb au enzime glicolitice active, precum şi mult glicogen.

1.2. MUŞCHII NETEZI

Muşchii netezi sau viscerali, ale căror fibre se contractă involuntar, lent şi susţinut.

1.3. MUŞCHIUL CARDIAC (MIOCARDUL)

Acesta deşi are origine mezenchimatoasă este de tip striat. Dar în timp ce fibrele muşchilor striaţi (ai vieţii de relaţie) sînt lungi şi independente unele de altele, fibrele miocardului sînt ramificate şi anastomozate într-o reţea sinciţială. Vitezele de concentraţie şi relaxare ale fibrelor miocardice sînt mai mici decît ale fibrelor musculare roşii.

Dintre aceste trei categorii, cei mai bine studiaţi sînt muşchii striaţi (scheletici) şi ca urmare, majoritatea noţiunilor ce alcătuiesc biochimia muşchilor se referă la acest tip de celulă musculară.

2. ORGANIZAREA ULTRASTRUCTURALĂ A MUŞCHIULUI SCHELETIC

2.1. FIBRA MUSCULARĂ

Muşchiul striat este alcătuit din fibre musculare lungi de 1 mm—4 mm, cu diametrul de 10—100 μ. Miocitul sau fibra musculară este o celulă multinucleată, al cărui volum este ocupat în majoritate de miofibrile, asamblate în „coloniţe" fine (coloniţele lui Leydig), înconjurate şi separate între ele prin sarcoplasmă, fluid vîscos ce poate avea consistenţa unui gel şi care conţine constituenţii solubili ai celulei. Miofibrilele sînt alcătuite din filamente groase şi subţiri. Membrana plasmatică este cunoscută ca sarcolemă, ce prezintă din loc în loc invaginaţii — vezicule şi caveole — implicate probabil în micro-

Scanned with OKEN Scanner

pinocitoza şi transportul materialelor către exteriorul fibrei. Sarcolema este asociată cu o componentă extracelulară de cca 500 Å, considerată ca „membrana bazală". Organitele celulare — nuclei, mitocondrii — sînt dispuse către periferie. Mitocondriile (sarcozomii Retzius, 1890) variază ca număr şi aşezare cu felul muşchiului. În muşchii foarte activi, roşii, mitocondriile sînt numeroase şi aşezate de-a lungul miofibrilelor, iar în muşchii mai puţin activi, ele sînt mai rare şi distribuite mai neregulat.

2.2. SISTEMUL DE MEMBRANE INTERNE

Fibra musculară este asociată cu un sistem de membrane interne compus din două formaţiuni de bază: reticulul sarcoplasmatic şi sistemul tubular, transversal „T". Reticulul sarcoplasmatic este omologul reticulului endoplasmatic din celelalte celule, iar sistemul „T" este o formaţie derivată din sarcolemă. El este alcătuit din tubuli orientaţi longitudinal sau transversal, în profunzimea fibrelor. Sistemul de tubuli, are o distribuţie regulată, pe direcţia longitudinală a fibrei. Între reticulul sarcoplasmatic şi sistemul „T" legătura se face prin „triadele" descrise de Porter şi Palade în 1957 şi „diadele" puse în evidenţă de Smith (1961) şi Hoyle (1965). Atît triadele cît şi diadele sînt alcătuite dintr-un element sarcolemic (tubulul), în comunicare cu formaţi-

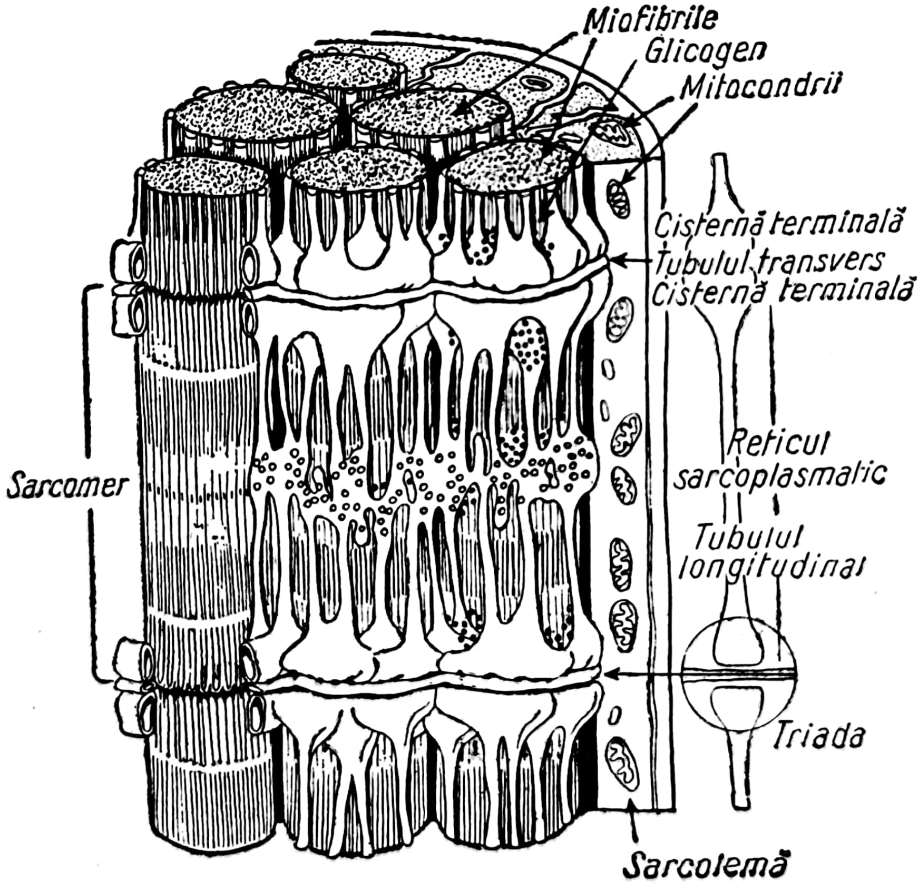


Fig. XVII.1. Sistemul de tubuli transversali şi reticulul sacroplasmatic din muşchi (adaptare după Petrides E. şi Lőffler S.).

uni cu aspect de saci, derivate din cisternele reticulului sarcoplasmatic (fig. XVII. 1). Din sistemul „T" sînt derivate şi veziculele care alcătuiesc aşa-numitul „factor de relaxare" şi a cărui inhibiţie se consideră că ar activa con-

tracţia. Sistemul membranar intern s-ar părea că joacă un rol în dirijarea excitaţiei de la suprafaţa membranei (sarcolema) spre interiorul fibrei, unda de depolarizare fiind răspîndită prin intermediul elementelor triadei, distribuite transversal în fibră.

Depolarizarea elementului central al triadei (din sistemul „T") ar declanşa eliberarea de ioni Ca^{++} — localizaţi în sacii laterali ai sistemului „T" — activatori ai miozin-ATP-azei care scindează ATP-ul generator de energie pentru contracţia musculară.

2.3. ULTRASTRUCTURA MIOFIBRILEI

Miofibrilele sînt structuri care posedă o periodicitate a elementelor constitutive cu pasul de cca 2,5 μ. Datele microscopice au arătat de-a lungul miofibrilei o alternanţă de zone sau benzi transversale luminoase, cu zone întunecate, cu indice de refracţie diferit. Acestea sînt benzile *A* (*anizotrope*), întunecate în lumina naturală şi luminoase în lumina polarizată, alternate cu *benzile I* (*izotrope*), luminoase în lumina naturală şi întunecate în lumina polarizată. Poziţia celor două feluri de benzi este diferită, după cum muşchiul este în contracţie sau relaxare. Zonele întunecate A prezintă în partea mijlocie o bandă transversală, zona *H* (sau *atriul Hansen*), care la rîndul său este centrată de o linie transversală fină, membrana sau discul *M* (*Mittelscheibe*), încadrată de două sublinii H. Zonele luminoase I sînt divizate în două printr-un sept transversal ce poartă numele de *discul Z* (*Zwischenscheibe*) sau *striul Amici*. La rîndul său, fiecare jumătate din banda I este subîmpărţită în două prin *discul N* (Nebenscheibe) fig. XVII. 2).

Ultrastructura sarcomerului unitate morfo-funcţională a muşchiului. Porţiunea dintr-o miofibrilă, cuprinsă între două discuri Z, consecutive, constituie un sarcomer, a cărui lungime este de 2—3 μ. Fiecare miofibrilă este alcătuită din sute de sarcomeri, aşezaţi cap la cap. Un sarcomer include deci următoarele părţi constitutive: *semibanda I* subdivizată în două prin *discul auxiliar N*; *banda A*, cu *zonele H* mărginite cu subliniile H şi împărţite

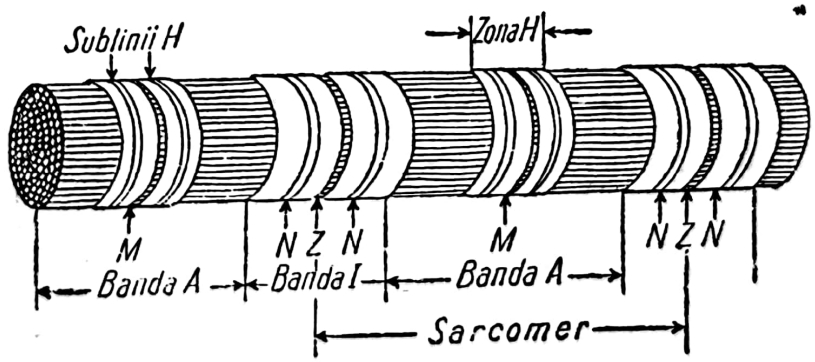


Fig. XVII.2. Reprezentarea schematică a ultrastructurii miofibrilei.
Sarcomer=porţiunea cuprinsă între două discuri Z.

în două prin *membrana M* şi iarăşi o *semibandă I*. Cercetări mai exacte ale structurii submicroscopice şi macromoleculare ale fibrei musculare, diagramele de difracţie a razelor X, înainte şi după extracţia selectivă a proteinelor miofibrilare, au condus la corelarea datelor morfologice prezentate cu cele

Scanned with OKEN Scanner

din biochimia proteinelor contractile şi reglatoare. În acest sens se pot da cîteva precizări. Din striurile Z ies de ambele părţi filamente subţiri de actină, îndreptate către mijlocul sarcomerului, lăsînd (în stare de relaxare) un spaţiu liber în mijloc. În zona centrală a sarcomerului — banda A — se găsesc fila-

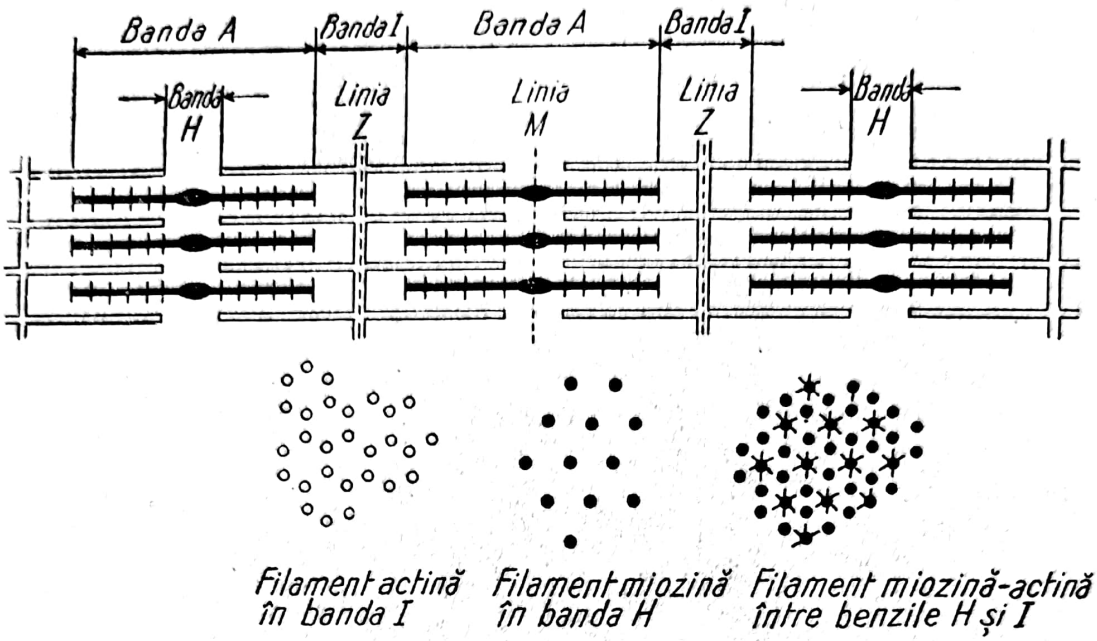


Fig. XVII.3. Secţiuni transversale prin diferitele zone ale sarcomerului: relaţiile de simetrie de ordin 3 şi 6, între filamentele de actină şi cele de miozină.

mente groase de miozină care prezintă în mijloc o îngroşare, membrana M. Filamentele fine, vizibile pe toată lungimea benzilor luminoase I şi care pătrund şi în banda A, intrînd în zona H dar fără să atingă membrana N, sînt formate din actină. Există deci zone de suprapunere ale celor două tipuri de filamente. Pe secţiunile transversale de sarcomer — în funcţie de nivelul la care se face secţionarea — se observă fie numai filamente de miozină sau de actină, fie ambele. Cînd secţiunea prinde cele două feluri de filamente, ies în evidenţă elemente de simetrie de ordinul 3 sau 6. Fiecare filament de miozină se găseşte în centrul unui hexagon ale cărui vîrfuri sînt ocupate printr-un filament de actină; fiecare filament de actină se găseşte în centrul unui triunghi ale cărui vîrfuri sînt reprezentate de miozină (fig. XVII.3). Filamentele groase din benzile A, de aproximativ 1 500 Å fiecare, constau din fascicule de molecule de miozină, rînduite paralel cu axul longitudinal al fibrei. Moleculele de miozină posedă pe întreaga lor lungime unele prelungiri sub formă de punţi transversale (90 Å lungime), dispuse helicoidal (la 60° rotaţie şi 143 Å translaţie) care leagă filamentele groase de miozină cu cele şase filamente subţiri, înconjurătoare de actină. Fiecare prelungire este făcută din capul unei molecule de miozină.

3. COMPOZIŢIA CHIMICĂ A MUŞCHIULUI

În compoziţia muşchiului se pot deosebi:

— *constituenţi comuni* cu celelalte ţesuturi (de ex. proteine, enzime);

— *constituenţi specifici muşchiului*, indispensabili funcţiei sale (fosfagen, proteine contractile, proteine reglatorii);

Scanned with OKEN Scanner

— *constituenți comuni* cu celelalte țesuturi *dar cu distribuție specifică funcției mușchiului* (creatină, electroliți, ATP, glicogen).

Este de subliniat aspectul caracteristic mușchiului, acela că aproape 50% din proteinele structurale au o activitate enzimatică, miozin-ATP-azică, fapt care face din enzime unități structurale și funcționale ale celulei.

3.1. CONSTITUENȚI MINERALI

Țesutul muscular care reprezintă cca 40% din greutatea corporală conține 75—80% apă. Compoziția electrolitică (în mg %) este următoarea: K^+ (320—400), Ca^{2+} (8), Na (80), Mg^{2+} (21), Cl^- (70), SO_4^{2-} (urme), HCO_3^- (15), PO_4^{3-} (7). Este de subliniat preponderența ionilor K^+ — în special în lichidul intracelular — corelat cu rolul acestui cation în metabolismul muscular. Hipokalemia conduce la tulburări cardiace iar hiperkalemia determină tulburări electrocardiografice. Ionii Mg^{2+} și Ca^{2+} sînt activatori sau inhibitori a numeroase sisteme enzimatice musculare așa cum reiese din rolul pe care acești cationi îl au în declanșarea și desfășurarea contracției musculare, după cum se va vedea mai departe.

3.2. CONSTITUENȚI ORGANICI

3.2.1. SUBSTANȚE CU GREUTATE MOLECULARĂ MICĂ (EXTRACTIBILE)

Mușchiul conține o serie de substanțe organice, hidrosolubile, cu greutate moleculară mică. Pot fi menționate în special nucleotizii, aminoacizii și derivații lor, creatina, creatinina, purinele, acidul uric, nucleotidele: AMP, ADP. ATP, acidul inozin-monofosforic (IMP), acidul guanilic (GMP), acidul uridilic (UMP). Dintre aceste substanțe, trei componente sînt specifice și importante pentru metabolismul funcțional al mușchiului: (a) *ATP* prezent în toate țesuturile, atinge în mușchi un nivel foarte ridicat, cca 5 milimoli/kg, indispensabil metabolismului și funcției acestui țesut. Este localizat în special în banda I, printre filamentele de actină. Rolul său mai în amănunt va fi prezentat mai departe. (b) *Creatina* este o componentă esențială, a cărei concentrație reprezintă peste 1/2 din azotul neproteic al mușchiului, ridicîndu-se la 20 milimoli/kg. Preponderent se găsește ca fosfocreatină (fosfagen), care împreună cu ATP reprezintă rezervorul de compuși macroergici ai mușchiului. Concentrațiile relative ale celor doi compuși sînt variabile, în funcție de tipul morfo-funcțional al mușchiului și sînt redate în tabelul XVII.1.

Tabelul XVII.1

Concentrațiile relative ale ATP și creatinfosfatului în diferite tipuri de mușchi

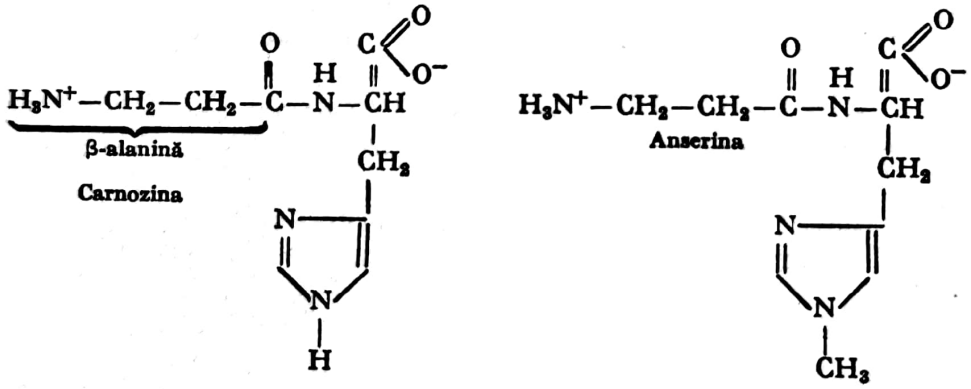
Tipul mușchiului	ATP mmoli/kg țesut	Creatinfosfat mmoli/kg țesut
Scheletic	5	20
Neted	2	0,7
Miocard	1,5	2

Scanned with OKEN Scanner

Se remarcă valorile ridicate ale concentraţiilor celor două substanţe şi mai ales a fosfagenului, la nivelul musculaturii de activitate voluntară şi rapidă. Dacă sinteza de ATP se petrece în toate ţesuturile prin fosforilare oxidativă, biosinteza creatinei se petrece numai în ficat şi în rinichi, de unde este preluată apoi de muşchi, prin circulaţia generală. Cele două trepte ale sintezei sînt: prima, formarea guanidinacetatului, ce se realizează prin transferul grupului amidinic din arginină la glicină, sub acţiunea arginin-glicin-transamidinazei; a doua treaptă, metilarea guanidinacetatului prin metionina activată, dă naştere creatinei. În muşchi se face şi transformarea creatinei în creatinină care trece în sînge şi se elimină prin rinichi: cantitatea zilnic formată fiind în raport strîns cu masa musculară. În fig. XVII.4 este prezentat circuitul creatinei.

Carnitina (20—50 mg % sau 1,5—3 m mol/kg) este al treilea component specific al muşchiului. Din punct de vedere al structurii chimice, este o betaină care mediază transferul legăturilor acil CoA prin membranele mitocondriale (fig. XVII.5). Provine — cu mare probabilitate — din acidul glutamic.

O altă componentă prezentă în concentraţie mare, este *carnozina* — dipeptid din histidină şi β-alanină — care atinge nivelul de 200 mg %, cca 10 milimoli/kg, a cărui funcţie nu este încă bine lămurită. Un compus analog prezent în muşchi este *anserina*, dipeptid din β-histidină şi β-alanină.



3.2.2. SUBSTANŢE CU GREUTATE MOLECULARĂ MARE NEAZOTATE

Lipidele musculaturii aparţin preponderent fosfatidelor, ce reprezintă componente ale mitocondriilor şi membranelor celulare.

Glicogenul este prezent în concentraţii variabile de la 0,5—1 g %, putînd oscila însă între 0,2—4 g %. Cantitatea de glicogen muscular este de acelaşi ordin de mărime cu aceea hepatică (deşi concentraţia musculară este mică), dacă se are în vedere masa considerabilă pe care o reprezintă musculatura din greutatea totală a organismului. Datorită intensităţii de utilizare a glicogenului în muşchi, sînt prezenţi în acest ţesut intermediarii glicolizei şi ai ciclului citric. Dintre aceştia, preponderent sînt: glucozo-6-fosfatul, acidul 3-fosfogliceric şi acidul lactic.

3.2.3. PROTEINELE

Fixînd drept criteriu de clasificare, localizarea proteinelor în ţesutul muscular ele se pot grupa în patru categorii: (a) *proteinele sarcoplasmatice*, (b) *proteinele granulare* sau ale organitelor celulare, nuclei, mitocondrii sau

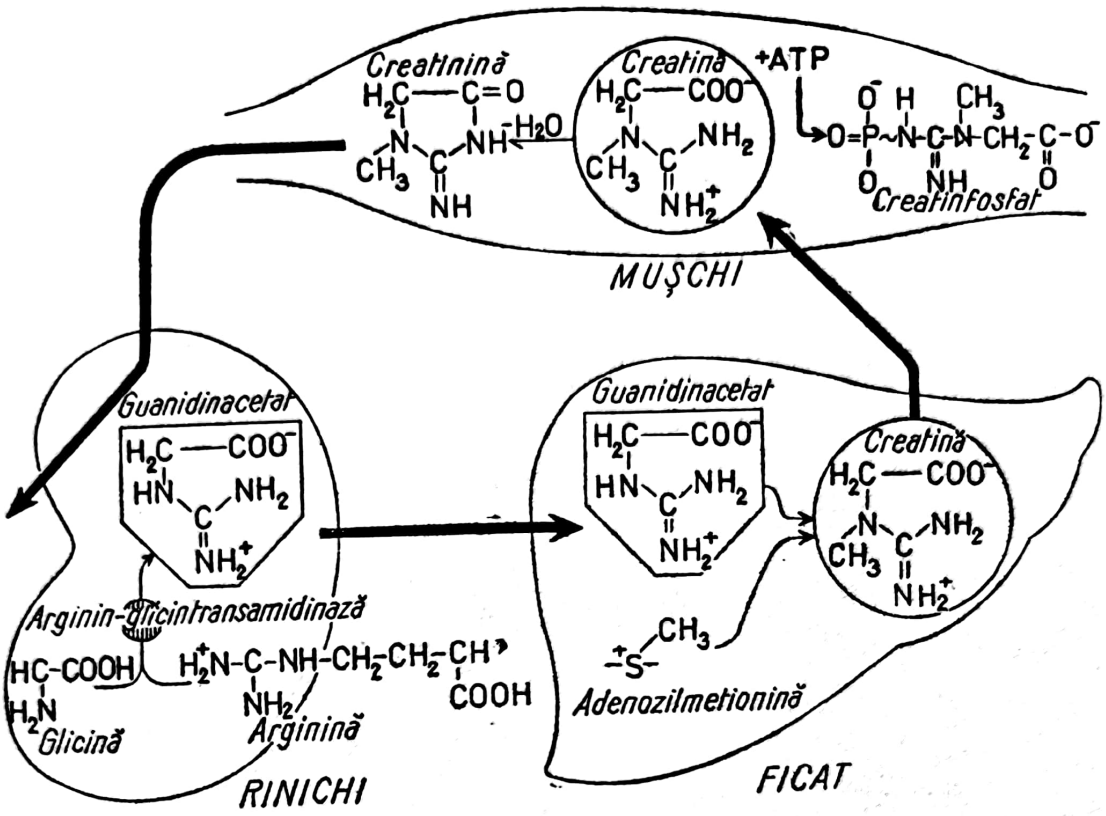


Fig. XVII.4. Circuitul creatinei.

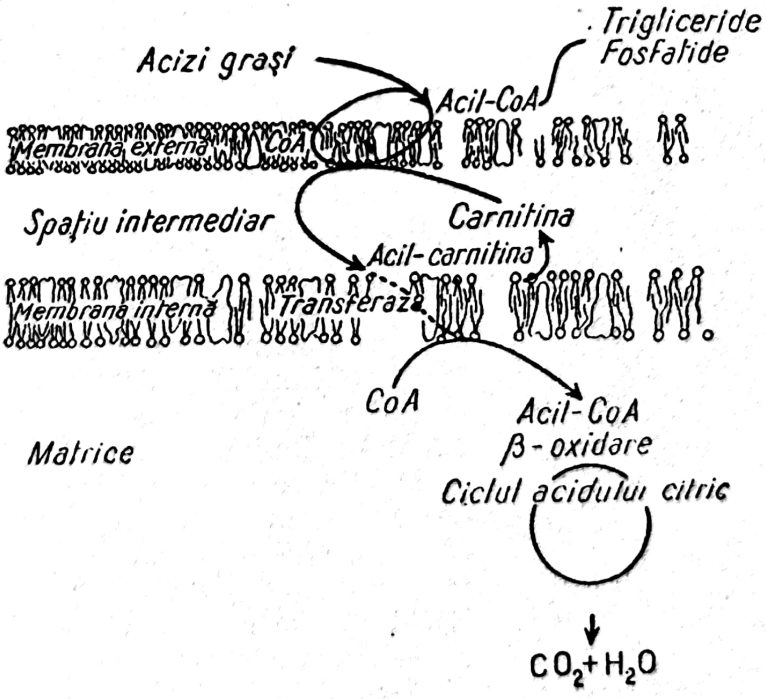


Fig. XVII.5. Carnitina şi rolul său în transferul legăturilor acil CoA prin membranele mitocondriale.

Scanned with OKEN Scanner

sarcosomi, de o deosebită importanţă în metabolismul energetic al muşchiului, (c) *proteinele miofibrilare* — funcţionale — structurale (miozina, actina) şi cele reglatorii (tropomiozina şi complexul troponinic), (d) *proteinele stromei*,

Tabelul XVII.2

Conţinutul procentual de enzime glicolitice din proteinele musculare hidrosolubile

Enzima	Concentraţia procentuală
Fosforilaza	6,2
Fosfoglucomutaza	1,9
Aldolaza (fructozo—1—6—difosfataldolaza)	9,6
Trifosfat-izomeraza	3,1
3-Fosfogliceraldehid dehidrogenaza	22,6
Fosfogliceratkinaza	3,1
Fosfogliceratmutaza	3,7
Enolaza	12,2
Piruvatkinaza	4,4
Lactatdehidrogenaza	3,3
Creatinfosfokinaza	5,7
Adelinatkinaza	0,4
Total	72,2

ce conţin substanţe de natură colagenă. Aceste proteine rămîn după extracţia celorlalte grupări de proteine. Printre acestea se întîlneşte şi mioglobina.

3.2.3.1. *Proteinele sarcoplasmatice.* Miogenul reprezintă 28—30% din proteinele totale musculare, uşor extractibile. Conţine în majoritate enzime glicolitice a căror participare procentuală la compoziţia miogenului este redată în tabelul XVII.2 (după Czak şi Bücher). Se remarcă preponderenţa 3-fosfogliceraldehid-dehidrogenazei, a enolazei şi fructozo-1-6-difosfataldolazei.

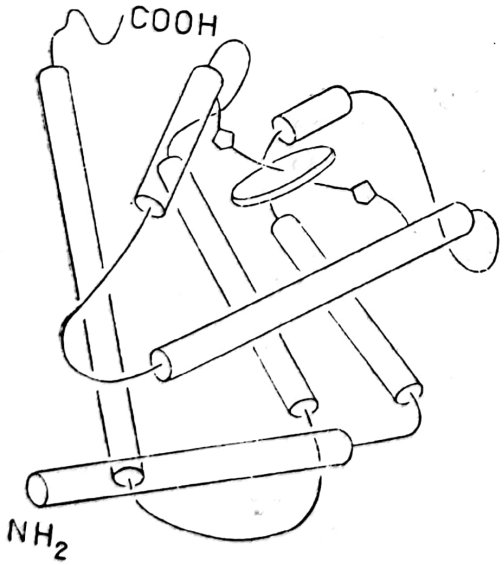


Fig. XVII.6. Structura schematică a mioglobinei (după Kendrew).

Mioglobina (cu denumirea veche miohemoglobina) reprezintă un component principal al muşchiului. Este o proteină globulară (greutatea moleculară 16 770—17 000) care conţine un singur lanţ polipeptidic de 153 resturi aminoacidice, ordonaţi spaţial cu lanţurile izolate ale hemoglobinei (fig. XVII.6). Conţine un grup prostetic — hemul — identic cu cel din hemoglobină, capabil de oxigenare şi de oxigenare reversibilă. Structura sa primară, secundară şi terţiară este bine cunoscută în urma lucrărilor lui Kendrew (vezi Cap. III). Are cîteva importante caracteristici structurale: moleculă compactă, grupările polare ale aminoacizilor sînt distribuite la suprafaţă, iar grupările hidrofobe în interior. În zonele de îndoire are resturi de prolină, izoleucină şi serină (aminoacizi ce formează cu greu α-helix). Mioglobina

Scanned with OKEN Scanner

doate lega o moleculă de oxigen dar cu afinitate mult mai mare decît hemoglobina; curba sa de disociere este un arc de hiperbolă echilateră. Mioglobina reprezintă pentru mușchi un rezervor de oxigen. Important este faptul că se încarcă cu oxigen la presiuni mult mai scăzute decît acelea la care se încarcă hemoglobina. La presiunea de oxigen a sîngelui venos mioglobina este saturată pînă la 95%. Miocardul* conține multă mioglobină și citocromi.

3.2.3.2. *Proteinele miofibrilare.* Acestea se împart în: proteine contractile, proteine reglatoare, componente proteice minore cu funcție necunoscută. Principalele proteine miofibrilare cunoscute astăzi sînt: miozina, actina (sau miozina B), iar proteinele reglatoare sînt tropomiozina și complexul troponinic.

a) *Proteine contractile. Miozina* reprezintă 35% din totalul proteinelor musculare și 55—60% din proteinele miofibrilare, fiind localizată în filamentele groase ale miofibrilei. Ambiguitățile care există referitoare la dimensiune, compoziție și conformație tridimensională a moleculei se datoresc dificultăților de studiu care decurg din disimetria moleculei și din tendința de asociere cu alte molecule sau de polimerizare. Miozina se extrage în soluție salină 0,6 M KCl (la pH alcalin sau neutru) și precipită prin diluție sau prin dializă. Molecula este fibrilară și are o lungime de 16 000 Å, cu grosime de 30 Å. Este disime-

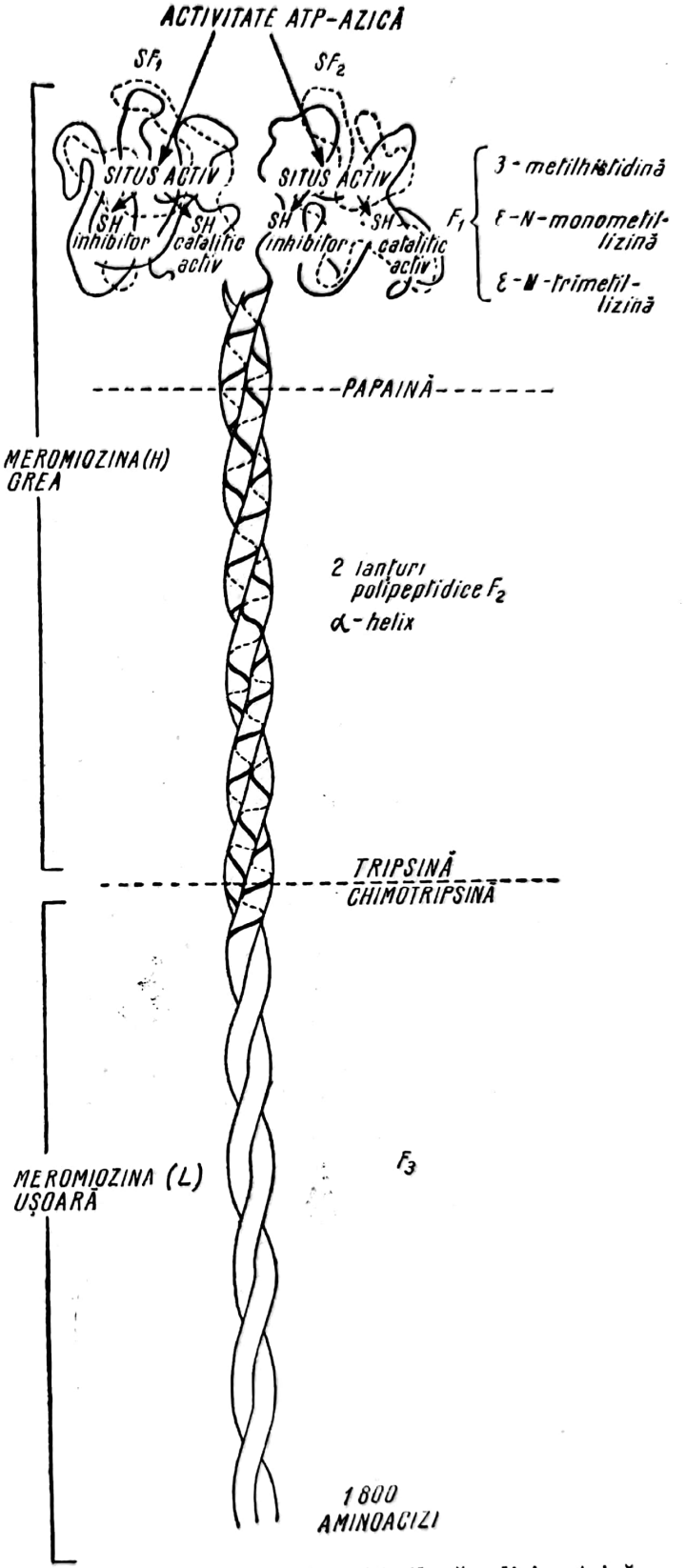


Fig. XVII.7. Molecula fibrilară disimetrică a miozinei (adaptare după Lehninger).

* Încărcătura foarte ridicată a mușchiului cu mioglobină se observă la animalele scufundătoare, care pot sta multe ore sub apă (foca, morsa, balena).

Scanned with OKEN Scanner

trică, avînd un capăt globular (fig. XVII.7). Soluţiile de miozină prezintă fenomenul de „birefrigerenţă de scurgere*“ datorită disimetriei moleculare. Molecula de miozină este un dimer: conţine două lanţuri polipeptidice identice, cu greutate moleculară 200 000—250 000 daltoni ce pot fi separate prin tratarea miozinei cu uree sau guanidină. Sînt cele mai lungi lanţuri polipeptidice cunoscute, avînd fiecare 1 800 de resturi aminoacidice. În majoritatea lungimii lor, lanţurile au conformaţia α-helicoidală, răsucindu-se unul în jurul celuilalt într-o structură dublu helicoidală. Ambele lanţuri posedă structuri globulare la capete, la care sînt ataşate încă două lanţuri polipeptidice mai mici. Compoziţia aminoacidică arată o mare bogăţie în acizi monoaminodicarboxilici şi diaminomonocarboxilici, deci o mare bogăţie de grupări polare, ce poate explica intensa activitate biochimică a proteinei, în special faţă de ioni. Prin clivaj proteolitic blînd — cu tripsină sau chimotripsină — molecula a fost scindată în două fragmente numite *meromiozine*: unul din fragmente *L-meromiozina* (LMM) sau miozina uşoară are greutatea moleculară 12 000 daltoni, cu lungimea de cca 900 Å şi diametrul 20 Å iar celălalt *H-meromiozina* (HMM) cu greutate moleculară 320 000 daltoni, lungime cca 800 Å şi diametrul 30 Å. Sînt desemnate de asemenea şi ca fragmente (F_1+F_2) şi F_3. Tratarea cu papaină scindează miozina în două fragmente, provenite din capătul globular — numite SF_1 — şi un fragment lung corespunzător porţiunii filiforme a moleculei (F_2+F_3). Miozina are două proprietăţi biochimice fundamentale.

— Activitate ATP-azică hidrolizînd ATP-ul. Această proprietate a fost pusă în evidenţă de Engelhardt şi Liubimova în 1939. Hidroliza legăturii fosforice terminale se produce şi cu celelalte nucleotide ca GTP, ITP, CTP.

— Capacitatea de a se combina cu alte componente şi în special cu o altă proteină miofibrilară, actina, producînd actomiozina.

Activitatea ATP-azică a miozinei are cîteva caracteristici importante pentru metabolismul funcţional al muşchiului şi anume: prezintă două valori de pH optim de activitate, 6 şi 9,5; necesită mici cantităţi de KCl şi este puternic stimulată de ionii K^+ sau Ca^{++} iar, în anumite condiţii, este inhibată de Mg^{++}. După constituirea actomiozinei, ionii de Mg^{++} au un efect favorabil. Influenţa cationilor bivalenţi — cel puţin în cazul Mg^{++} — este explicată de Szent György prin formarea unui complex ciclic (chelat) între metal şi nucleozid-trifosfat. Activitatea este dependentă de două clase diferite de grupări SH care se deosebesc prin susceptibilitatea lor la alchilare sau la formare de mercaptide. Clasa de grupări SH, mai susceptibilă la aceste reacţii, funcţionează ca inhibitor intern sau intramuscular al enzimei, iar cea nesusceptibilă este gruparea activă în procesul hidrolitic. Ea aparţine centrului activ al miozin ATP-azei, fiind situată în partea globulară, terminală (capul) moleculei şi aparţine secvenţei aminoacidice; izoleucil, cisteinil-arginină. Capacitatea de legare a actinei de miozină este localizată în fragmentele SF_1 care au şi activitate ATP-azică. Combinaţia cu actina se face prin intermediul aceleiaşi clase de grupări tiol, din extremitatea globulară a moleculei de miozină. Blocarea acestor grupări tiolice suprimă simultan activitatea ATP-azică şi aptitudinea de formare a actomiozinei.

* Cînd soluţia de miozină nu este agitată, moleculele fiind orientate la întîmplare, au indice de refracţie identic în toate direcţiile. La trecerea printr-un capilar moleculele se orientează în direcţia unică a curgerii, soluţia devenind optic anizotropă.

Scanned with OKEN Scanner

Energia ce rezultă din scindarea legăturii fosforice din ATP. este transferată moleculei de miozină, pentru a fi utilizată în contracţia musculară. Se consideră că transferul s-ar face în doi timpi: transferul energiei în nucleul purinic şi apoi transferul în miozină. Metalul bivalent facilitează transferul energiei din legătura fosfatică în nucleul purinic, cu formarea unui chelat cuaternar. Sînt multe neclarităţi şi contradicţii, poate numai aparente, care grevează această încercare de elucidare a mecanismului de transfer energetic.

— *Actina* reprezintă cantitativ 14% din proteinele musculare şi 20% din greutatea totală a miofibrilei. Se găseşte în două forme: ca monomeri G-actina (globulară) şi F-actina (fibrilară) şi ca polimer de G-actină. Forma G are greutate moleculară determinată cu aproximaţie, din cauza tendinţei de polimerizare. Variază, după diferiţi autori, între 24 000, 46 000 sau 56 000. Forma polimerizată F-actina are greutate moleculară de ordinul milioanelor. Molecula de G-actină este puternic disimetrică măsurînd $\frac{29\text{ Å}}{24\text{ Å}}$. Ea este constituită de un singur lanţ polipeptidic a cărui secvenţă aminoacidică este de tipul N-acetil-asp-glu-thr. Caracteristic este faptul că o moleculă de G-actină conţine restul unui aminoacid neobişnuit, ε-N-metil-lizina cu un mare număr de resturi de prolină şi 7 resturi de cisteină. Trecînd prin stadiul de

$$CH_3NHCH_2CH_2CH_2CH_2CHCOOH$$
$$\qquad\qquad\qquad\qquad\qquad\qquad\qquad\quad |$$
$$\qquad\qquad\qquad\qquad\qquad\qquad\qquad\quad NH_2$$

ε-N-metilizina

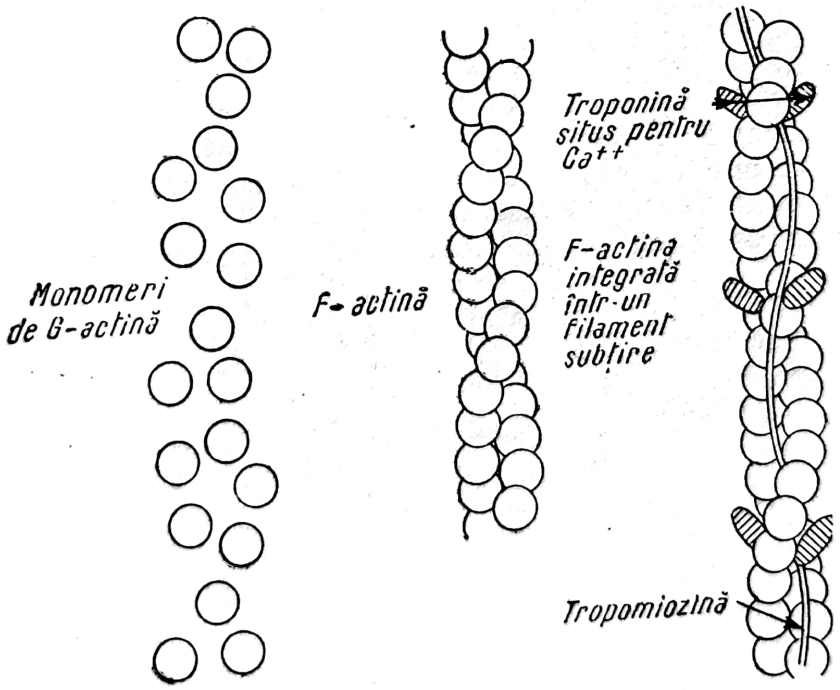


Fig. XVII.8. Molecula de F actină alcătuită din monomeri de G actină; două fire răsucite unul în jurul celuilalt.

dimer, G-actina se polimerizează cu transformarea structurilor α-helicoidale în structura β, în foaie pliată. F-actina este alcătuită din două rînduri de monomeri de G-actină răsucite, realizînd un filament cu diametrul de cca 60 Å (fig. XVII.8). Actina formează scheletul filamentelor musculare subţiri şi al

Scanned with OKEN Scanner

benzilor Z. Transformarea G-actinei în F-actină se face cu participarea ATP-ului. Monomerul globular posedă un situs de legătură între ATP şi altul pentru ionul Ca^{++}, pe care-l leagă puternic, fapt ce poate fi corelat cu rolul acestui cation în iniţierea contracţiei şi activitatea ATP-azei. Prin polimerizarea G-actinei în F-actină se liberează fosfat anorganic, cu producerea unui complex F-actină-ADP. Polimerizarea este exprimată în ecuaţia:

$$n(\text{G-actină-ATP}) \xrightarrow[\text{Mg}^{++}]{} \underset{\text{(F-actină)}}{(\text{G-actină-ADP})_n} + nP_i$$

Dintre nucleotizii polifosforici naturali ITP poate să înlocuiască ATP în această reacţie. În agregarea monomerilor intervin însă şi legături de tipul punţilor de hidrogen.

— *Actomiozina.* Complexele de actomiozină pot fi extrase din muşchi, prin acţiunea prelungită a unei soluţii 0,6 M KCl. Raportul molar al monomerilor de $\frac{\text{G-actină}}{\text{F-actină}}$ în complexele de actomiozină, este aproximativ 1 : 1. Un lanţ de F-actină, ce conţine mai mulţi monomeri de G-actină, poate lega mai multe molecule de miozină. Numai capetele globulare ale miozinei se leagă de actină. Actomiozina posedă activitatea ATP-azică mai intensă chiar decît a miozinei, de care se deosebeşte printr-o serie de proprietăţi: pH optim în zona neutră (miozin-ATP-aza în zona alcalină), este inhibată de ionii Ca^{++} şi activată de ionii Mg^{++}, invers decît miozin-ATP-aza. Dacă actomiozina exercită o acţiune asupra-ATP-ului şi acesta — la rîndul său — poate modifica profund caracterele actomiozinei. El scade vîscozitatea şi birefrigenţa soluţiei de actomiozină, disociind complexul, cu separarea celor două componente, actina şi miozina.

Complexele de actomiozină se disociază în prezenţa de ATP şi Mg^{++}. Simultan se produce hidroliza ATP-ului. Cînd aceasta este completă, actina şi miozina se reagregă. Disocierea şi reasocierea actomiozinei pot reprezenta trepte ale înreruperii şi stabilirii legăturii în cursul contracţiei şi între contactele dintre filamentele groase şi subţiri ale miofibrilei. Cu filamentele de actomiozină s-au realizat interesante modele experimentale ale muşchiului. Filamentele de actomiozină se scurtează cînd se adaugă ATP într-o soluţie de 0,5 M KCl, în prezenţa ionilor de magneziu (în soluţie 10^{-3} M). Se creează astfel o tensiune asemănătoare celei realizate în contracţia musculară.

b) *Proteine reglatoare: tropomiozina şi complexul troponinic.* Cele două proteine reglatoare tropozina şi complexul troponinic sînt două proteine filamentoase ce reprezintă împreună 10% din greutatea miofibrilei şi cca 5% din totalul proteinelor musculare.

— *Tropomiozina* (sau paramiozina) se prezintă în două forme: tropomiozina A şi tropomiozina B. Este hidrosolubilă, prezentă în toţi muşchii (la om) ca important component al filamentelor subţiri din zona I fiind localizată în jgheabul dublei spirale de F-actină (vezi fig. XVII. 8). Molecula sa are o lungime de 450 Å şi o grosime de 20 Å, cu o greutate moleculară de 130 000 daltoni. Este alcătuită din două lanţuri polipeptidice asemănătoare, dacă nu identice, cu greutate moleculară 70 000 daltoni fiecare, ambele avînd configuraţia α-helicoidală, aproape în toată lungimea lanţului. Sînt răsucite unul în jurul celuilalt, realizînd un aranjament suprahelicoidal ca în porţiunea „caudală" a miozinei. Nu s-a putut decela încă nici o grupare aminoterminală

Scanned with OKEN Scanner

în molecula acestor polipeptide şi se sugerează (Tsao) că ar fi alcătuite din lanţuri peptidice ciclice. Ca şi celelalte proteine musculare, tropomiozina se combină uşor cu alţi compuşi. Combinaţia sa cu actina, actotropomiozina reacţionează ca şi actomiozina la adăugarea de ATP dar nu o poate înlocui în contracţia musculară, datorită labilităţii ce o caracterizează.

— *Troponina* reprezintă 3—5% din greutatea miofibrilei. Are greutate moleculară 80 000 daltoni şi este alcătuită din trei subunităţi cu proprietăţi diferite: a) o unitate care împreună cu tropomiozina, inhibă legarea capului miozinei cu actina; b) o unitate ce leagă puternic ionii de Ca^{++} suferind o modificare conformaţională care anihilează influenţa inhibitorie a primei unităţi asupra interacţiunii dintre miozină şi actină; c) o proteină care determină legarea dintre troponină şi tropomiozină.

4. CONTRACŢIA MUSCULARĂ

Procesul comportă două importante categorii de fenomene ce se cuplează în acţiunea de contracţie musculară: fenomene chimice şi fenomene mecanice. Pentru înţelegerea pe cît este posibil în prezent a integrării acestor două categorii de procese, este necesară prezentarea planului metabolic al muşchiului.

4.1. METABOLISMUL MUSCULAR

Acesta este caracterizat prin adecvarea transformărilor biochimice la condiţiile contracţiei, care impune consum mare de energie în timp foarte scurt. Deoarece alimentarea cu oxigen nu este pe măsura necesităţii energetice, muşchiul posedă o înaltă capacitate glicolitică anaerobă şi o încărcătură bogată de compuşi macroergici ATP şi creatin-fosfat (fosfagenul). Activitatea respiratorie intensă şi un aparat mitocondrial puternic se întîlnesc în muşchii tonici. Activitatea glicolitică este foarte puternică în muşchii tetanici. Ca substrat energetic muşchiul consumă glucide, acizi graşi şi corpi cetonici, în aerobioză iar în anaerobioză exclusiv glucide. Acest ţesut nu posedă glucozo-6-fosfatază, fapt care demonstrează că nu intervine în reglarea glicemiei.

4.1.1. METABOLISMUL ENERGETIC. GLICOGENOLIZA

Calea de degradare a glicogenului muscular este diferită în funcţie de condiţiile de oxigenare ale muşchiului. Au fost elaborate două teorii: una unitară şi una dualistă — pentru a explica mecanismul de degradare al glicogenului muscular.

Teoria unitară a lui Meyerhof — contradictorie în raport cu vederile clasice şi cu existenţa ciclului Cori — sugerează că degradarea glicogenului trebuie să se termine obligatoriu cu formarea de acid lactic, urmată de glucogeneză „in situ". Se pare că această teorie nu este în totală contradicţie cu realitatea. Datorită unor cercetări experimentale recente, ale lui Hiatt, se

admite că resinteza glicogenului în mușchi din acid lactic, nu este imposibilă. S-ar efectua cu trecerea directă de la acid piruvic la acid fosfoenolpiruvic, sub influența unei piruvinatkinaze.

Teoria dualistă (Lipmann). Conform acestei teorii, degradarea glicogenului se face în două moduri diferite: a) în aerobioză, trecînd prin acid piruvic și apoi pe calea ciclului tricarboxilic, procesul terminîndu-se prin producerea de $CO_2 + H_2O$ și b) în anaerobioză acidul piruvic este redus la acid lactic care, trecînd în sînge, este preluat de ficat pentru gluconeogeneză (ciclul Cori) și eventual — în mică parte — utilizat „in situ", cu același rezultat. Ca substraturi pentru oxidare, mușchiul utilizează în special glicogenul dar poate cataboliza și acizii grași sau corpii cetonici, ca material energogen. Aminoacizii nu sînt utilizați în mușchi în acest scop. Selectarea substratului este adecvată nevoilor de moment ale organismului și implică un control metabolic și umoral complex Mușchiul în repaus folosește glucoza, cu viteză relativ mică. În această stare cca 50% din glucoză este transformată pînă la acid lactic, ce trece în sînge, restul fiind ars pînă la $CO_2 + H_2O$ iar o mică parte este depozitată ca glicogen. Miocitul preia acizii grași din sînge, în funcție de concentrația acestora în sîngele arterial.

4.1.2. METABOLISMUL ACIZILOR GRAȘI

Acizii grași preluați din sînge sînt arși la nivelul miofibrilelor în proporție de 20%. Restul sînt depozitați ca trigliceride care la nevoie sînt hidrolizate iar acizii grași sînt oxidați cu producere de energie. Pentru sinteza triglicéridelor glicerolfosfatul este obținut din glicerol prin fosforilare pe seama ATP-ului și din reducerea dihidroxiacetonfosfatului, produs al glicolizei anaerobe. Prin această ultimă interrelație metabolică sinteza trigliceridelor în mușchi devine dependentă de viteza glicolizei. În travaliul muscular preluarea glucozei din sînge este de 10 ori mai mare decît în repaus iar glicogenoliza este activată prin stimularea fosforilazei. O bună parte din glucoză este trecută în acid lactic, determinînd creșterea lactacidemiei în efort (probă de explorare funcțională). Nivelul catecolaminelor crescut în efort determină creșterea lipolizei și a concentrației acizilor grași din sînge, urmată de preluarea crescută a acestora de către miocit cu activarea căilor metabolice de utilizare. În stare de nemîncare, nevoile energetice ale mușchiului sînt acoperite într-o măsură considerabilă (70%) prin oxidarea acizilor grași. Creșterea oxidării acestora determină în miocit o ridicare a concentrației de acetil-CoA. Blocarea glicolizei determină creșterea glucozo-6-fosfatului care — la rîndul său — inhibă hexokinaza. Experimental s-a arătat dealtfel — pe preparate de inimă izolate — că o supraofertă de acizi grași duce la reducerea preluării și consumului de glucoză. În stare de cetoză (diabet), inaniție, corpii cetonici sînt preluați și utilizați de miocit, proporțional cu concentrația din sînge. Oxidarea corpilor cetonici necesită activarea acetoacetatului la acetoacetil-CoA prin reacția de transfer:

$$\text{succinil-CoA} + \text{acetoacetat} \rightarrow \text{succinat} + \text{acetoacetil-CoA}$$

catalizată de succinil-CoA-acetoacetat transferaza.

Scanned with OKEN Scanner

4.1.3. METABOLISMUL COMPUŞILOR MACROERGICI: ATP ŞI CREATINFOSFAT (FOSFAGENUL)

Experienţa lui Lundsgaard, care a arătat că muşchiul intoxicat cu monoiodacetat* continuă să se contracte cîtva timp, a condus la descoperirea rolului pe care compuşii macroergici îl au în energetica musculară alături de procesele oxidative. O sursă imediată de energie este sistemul celor doi compuşi fosforilaţi macroergici, ATP şi creatinfosfatul care sînt cuplaţi prin creatinkinază (CPK), ce catalizează reacţia:

$$\text{ATP} + \text{creatină} \xrightarrow{\text{CPK}} \text{ADP} + \text{creatină} \sim \text{P}$$

Desfăşurarea reacţiei într-un sens sau altul depinde de raportul concentraţiilor reactanţilor. Sinteza creatinofosfatului este posibilă numai în perioadele de repaus, cînd se acumulează ATP. ATP-ul şi creatinfosfatul reprezintă o rezervă de legături macroergice a muşchiului în repaus, conţinutul în fosfocreatină fiind de 4—6 ori mai ridicat decît în ATP. În perioadele de activitate creatinfosfatul cedează ADP-ului restul fosfat macroergic, generînd ATP. ATP-ul este compusul a cărui descompunere (în ADP şi P_i) joacă rolul capital în concentraţia musculară în raport nemijlocit cu transformările proteinelor contractile, implicate în proces. El trebuie deci să fie sintetizat (prin fosforilarea ADP-ului) pentru a asigura contracţiile ulterioare.

În miocit, în perioada iniţială de activitate se utilizează mai întîi ATP-ul existent ca atare, după care urmează cel obţinut prin reacţia catalizată de creatin-fosfokinază:

$$\text{creatină} \sim \text{P} + \text{ADP} \xrightarrow{\text{CPK}} \text{creatină} + \text{ATP}$$

Energia legăturilor macroergice din ADP poate fi şi ea folosită prin intermediul reacţiei:

$$2\,\text{ADP} \rightarrow \text{ATP} + \text{AMP}$$

catalizată de miokinază (adenilatkinază). Activitatea contractilă prelungită a muşchiului este însă susţinută energetic numai prin sinteza continuă a ATP-ului prin fosforilări oxidative, cuplate fie cu secvenţa glicolitică anaerobă, fie cu lanţul respirator alimentat cu hidrogen provenit prin oxidarea acizilor graşi, a corpilor cetonici şi într-o mai mică măsură a glucozei. După încetarea activităţii creşte progresiv concentraţia ATP-ului şi se restabilesc rezervele tisulare de fosfagen.

4.2. TEORIILE CONTRACŢIEI MUSCULARE

Diferitele teorii propuse pentru a explica cuplarea fenomenelor chimice şi a celor mecanice în contracţia musculară, pot fi în esenţă reduse la două tipuri: teoria modificărilor conformaţionale şi teoria alunecării.

4.2.1. TEORIA MODIFICĂRILOR CONFORMAŢIONALE

Modificările conformaţionale ale proteinelor musculare, ce determină scurtarea lor (şi deci a filamentelor fibrilare), ar explica efectuarea contracţiei. În acest caz, proteinele contractile s-ar comporta ca resorturi cu variate gra-

* Monoiodacetatul blochează glicoliza la stadiul triozo-fosfaţilor.

Scanned with OKEN Scanner

de de contracţie şi relaxare. În fig. XVII. 9 a, este redat unul din modelele contracţiei musculare, bazată pe ipoteza spiralării, adică pe modificarea conformaţională a proteinelor contractile (după Podolski). În fig. XVII. 9 b, este redat modelul lui Morales.

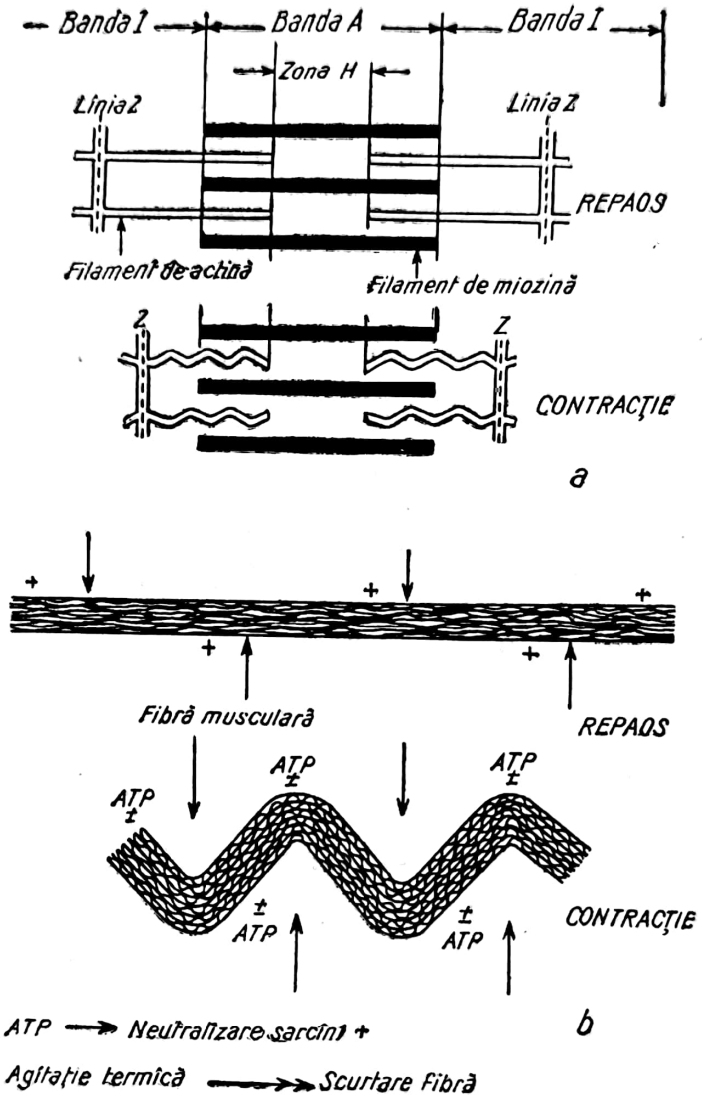


Fig. XVII.9. a) Un model al contracţiei musculare bazat pe modificarea conformaţională a proteinei contractile (ipoteza spiralării). b) Modelul Morales, mecanismul prin care legarea ATP induce contracţia.

Din analiza spectrelor de difracţie cu raze X s-a dedus că majoritatea proteinelor au conformaţia α-helicoidală. Pentru explicarea contracţiei musculare s-au făcut ipoteze atît în sensul posibilităţii de transformare a structurilor β, în „foaie pliată" în α-helicoidale, cît şi reciproc (Astbury). Această ultimă ipoteză a unei transformări denumită „supercontracţia"* configuraţiei

* Configuraţia „supercontractată" a fost descoperită în flagelul mobil al bacteriilor, mişcările ritmice ale acestuia fiind datorate transformărilor reversibile α—β. Învelişul contractil al cozii bacteriofagului este un veritabil muşchi monomolecular.

α într-o structură β transversă, a fost realizată experimental „in vitro" (prin tratarea actomiozinei cu agenţi fizici şi chimici blînzi, cît şi în cursul transformării actinei-G în actină-F). Transformarea aceasta nu a putut fi decelată pe muşchiul de om. Absenţa modificării în periodicitatea axială din timpul contracţiei musculare constituie un puternic argument în favoarea celui de al doilea tip de teorie, anume aceea a alunecării.

4.2.2. TEORIA ALUNECĂRII (HANSON-HUXLEY)

Alunecarea (glisarea) filamentelor de actină de-a lungul celor de miozină ar explica, după Hanson-Huxley, scurtarea muşchiului în contracţie. Este desigur teoria cea mai admisă pînă în prezent, deşi nu unanim recunoscută. Din alunecarea preconizată rezultă o apropiere a discurilor Z cu o scurtare a

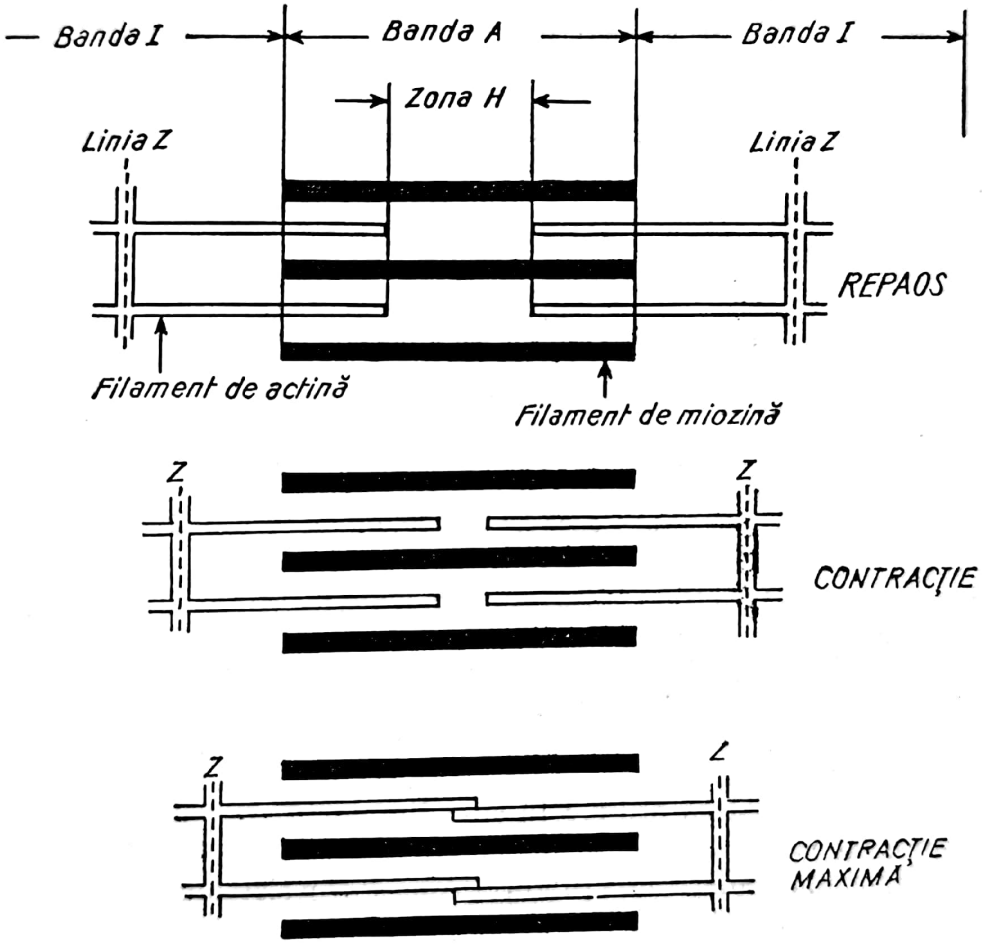


Fig. XVII.10. Reprezentarea schematică a teoriei „alunecării" Hanson-Huxley.

lungimii sarcomerului la cca 2/3 din lungimea pe care o are în stare de relaxare. Benzile I şi zona H îşi scurtează lungimea şi dispar aproape complet, în timp ce distanţa Z—H rămîne relativ constantă. Filamentele de actină şi cele de miozină se suprapun aproape complet, lungimile lor rămînînd aceleaşi (fig. XVII. 10). În timpul contracţiei, punţile „în cruce" se aşază astfel încît fac un unghi de 45° cu axa longitudinală a fibrei, stabilind un contact

Scanned with OKEN Scanner

între filamentele de miozină şi cele de actină. Bilanţul energetic al travaliului muscular a dus la concluzia că pentru o deplasare de 130 Å este necesară o moleculă de ATP. Viteza de scurtare a unui muşchi implică formarea a 30—100 punţi actină-miozină/secundă. Ca urmare a hidrolizei ATP-ului sub acţiunea miozin-ATP-azei, o punte eliberată din miozină se fixează

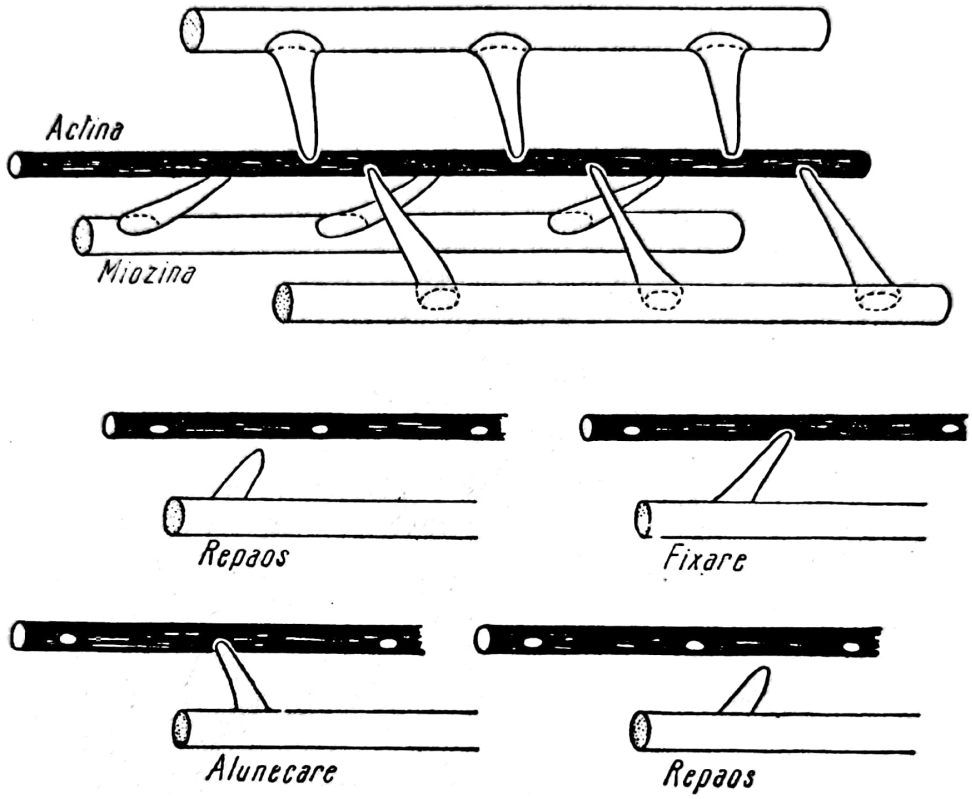


Fig. XVII.11. Mecanismul „cu clichet" ce poate interveni în alunecare.

pe situsul activ al actinei, apoi se retrage antrenînd filamentul de actină către centrul sarcomerului. Mişcarea se repetă la nivelul situsului următor al filamentului de actină. Deplasarea se produce deci printr-un mecanism „cu clichet" indicat în fig. XVII.11. Ţinînd seama atît de integrarea funcţională a proteinelor contractile şi a celor reglatorii, cît şi de reacţiile chimice fundamentale ce se asociază în contracţia musculară, desfăşurarea procesului poate fi considerată că are loc în şase timpi.

a) *Impulsul nervos* determină o schimbare a potenţialului de acţiune la nivelul sarcolemei, depolarizarea fiind transmisă prin sistemul „T", în membranele reticulului endoplasmatic, a căror permeabilitate creşte, ca urmare a acestei modificări.

b) *Ionii de calciu* sînt eliberaţi din cisternele reticulului endoplasmatic în sarcoplasma miofibrilelor, declanşînd interacţiunea dintre ATP şi filamentele groase şi subţiri din miofibrilă.

c) *Ionii* Ca^{++} interacţionează cu sistemul de proteine reglatoare, legîndu-se de troponină şi provocînd astfel o schimbare conformaţională a tropomiozinei şi a complexului troponinic.

d) Prin aceste modificări este dezinhibată interacţia actină-miozină, producîndu-se fixarea „capului" de legătură a miozinei cu actina.

Scanned with OKEN Scanner

e) Miozin-ATP-aza este activată prin actină şi hidrolizează o moleculă de ATP. Concomitent, se produce o schimbare conformaţională a capului miozinei.

f) Această modificare provoacă o mişcare a „punţii", condiţionînd realizarea mecanismului „cu clichet" ce deplasează actina.

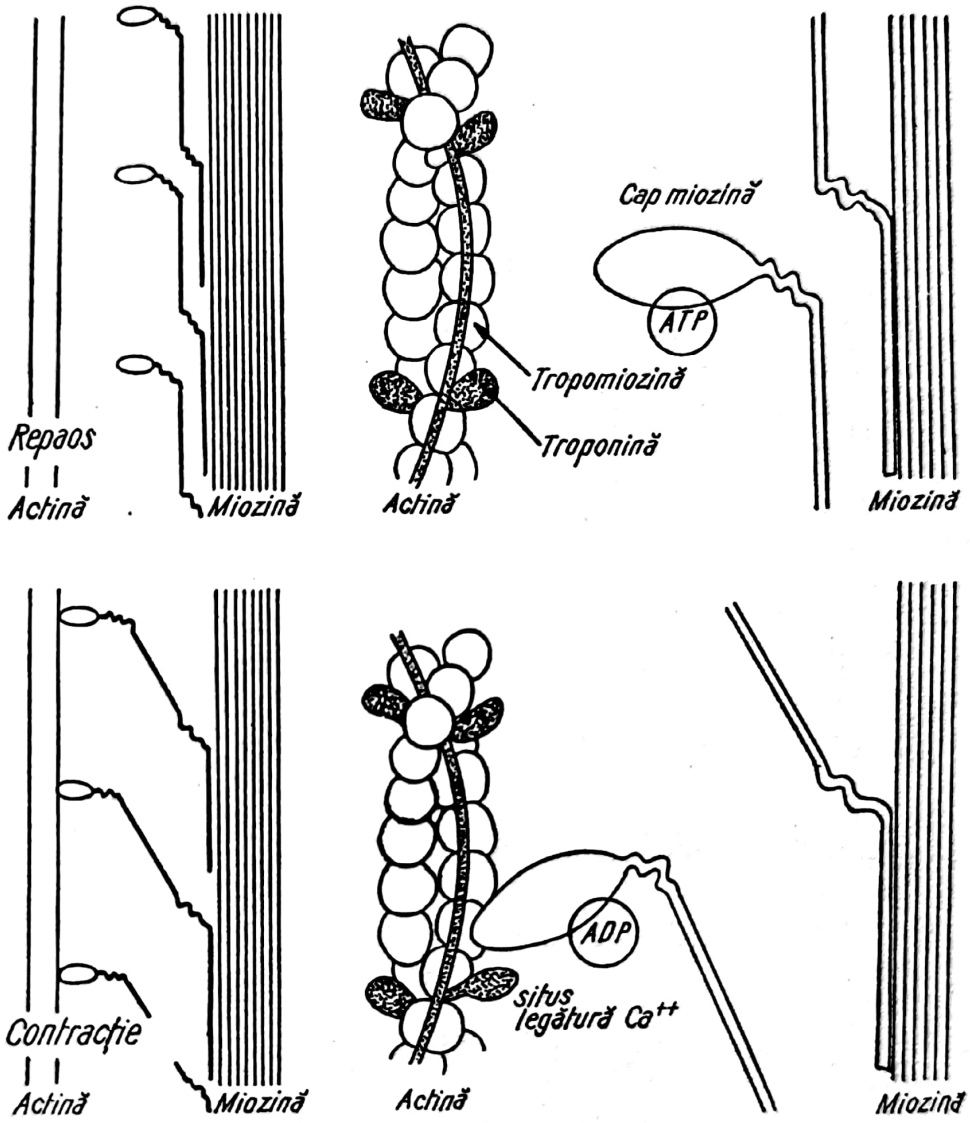


Fig. XVII.12. Interacţii morfo-moleculare în desfăşurarea contracţiei musculare.

Interacţiile morfomoleculare ale acestui mecanism sînt redate în fig. XVII.12.

Concentraţia şi mişcarea ionilor de calciu au o deosebită importanţă pentru desfăşurarea contracţiei musculare. În stare de relaxare concentraţia ionilor liberi de calciu este 1.10^{-7} M, ca urmare a sechestrării lor în reticulul endoplasmatic. Pentru fiecare moleculă de ATP hidrolizat, se acumulează unul sau mai mulţi atomi de Ca^{++}. Capacitatea reticulului sarcoplasmatic de a sechestra Ca^{++} este socotită „factor de relaxare" (releasing factor). Se presupune că segregarea Ca^{++} în reticulul sarcoplasmatic este rezultatul unui

Scanned with OKEN Scanner

transport activ printr-o pompă de Ca^{++}, ATP-dependentă ce poate funcţiona chiar împotriva gradientului de concentraţie. Prin studii recente s-a arătat că muşchii bogaţi în mitocondrii (fibre roşii), sechestrează Ca^{++} şi în aceste organite, în faza de relaxare. Concentraţia de cca 1.10^{-6} M a ionilor de Ca liberi (în sarcoplasmă) constituie *pragul* dincolo de care se declanşează contracţia. Această cantitate de Ca^{++}, liberată din reticulul endoplasmatic este suficientă pentru a satura situsul de legare din troponină. Actualmente se fac unele ipoteze ce încearcă să explice, cît mai profund, mecanismele de interrelaţie ce stau la baza cuplării fenomenelor chimice cu cele mecanice dar care nu reuşesc să clarifice esenţa fenomenului. Ele se referă în special, la reacţiile, chimice responsabile de formarea „punţilor de legătură" ce intervin în mecanismul alunecării. Se presupune că actina ar fi activată printr-o moleculă de ATP la nivelul unui carboxil. Această grupare activată ar reacţiona apoi cu o funcţie de tiol din H-meromiozină într-un mod analog formării de acil-CoA. Legătura tiol-ester formată ar putea acţiona secundar cu un hidroxil alcoolic sau fenolic al miozinei, liberînd o parte din energie. Carboxilul eliberat ar intra din nou în reacţie cu ATP-ul. În stare de repaus, mecanismul ar fi blocat printr-un inhibitor — factorul Marsh-Bendall, ce se identifică probabil cu miokinaza (adenilatkinaza). Acest factor este activat de Mg^{++} şi inhibat de Ca^{++}. Prin trecerea influxului nervos se produce o undă de depolarizare, generatoare de ioni de Ca^{++}, care deplasează ionii de Mg^{++} din asocierea lor cu factorul inhibitor. Acesta fiind înlăturat, activitatea ATP-azică a miozinei este liberă să se exercite cu toate consecinţele mecano-chimice cunoscute.

În literatura românească de specialitate sînt expuse ipoteze, concepţii şi teorii ale contracţiei musculare pînă în 1970, în monografia „Biochimia concentraţiei musculare" de M. Şerban şi Dida Cotariu.

5. PATOLOGIA BIOCHIMICĂ A MUŞCHIULUI

5.1. PATOLOGIA ÎNNĂSCUTĂ

(DISTROFIILE MUSCULARE ÎNNĂSCUTE)

Distrofiile musculare progresive aparţin grupului de afecţiuni genetice umane cel mai frecvent întîlnite. Bazele moleculare ale acestora nu sînt bine cunoscute. Sînt observate unele aspecte dismetabolice — în special în miopatia malignă Duchenne — cu transmisie X — recesivă, ce nu se pot sistematiza într-o concepţie patogenică la nivel molecular. Atrofia difuză musculară este corelată cu pierderea prin revărsarea în circulaţie a principalelor enzime sarcoplasmatice: fructozo-1-6-difosfat-aldolaza, lactat-dehidrogenaza, mai ales izoenzima sa LDH5, fosfocreatinkinaza. Se pare că se produce atît deprimarea energogenezei celulare, cît şi utilizarea insuficientă a legăturilor fosfatmacroergice pentru întreţinerea mecanismelor endergonice de control ale permeabilităţii selective ale sarcolemei. În stadii mai avansate glicoliza anaerobă scade pînă la 25% din valoarea normală. S-a pus în evidenţă, în anumite faze şi un turn-over exagerat al miozinei, interpretat ca expresie a unui catabolism crescut caracteristic muşchiului embrionar, concordant cu „fetalizarea" unor modele izoenzimatice (aldolaza, LDH, cu preponderenţa

Scanned with OKEN Scanner

fracţiunii a III-a hibride). Ca expresie a tulburării metabolismului muscular şi ca indicator al severităţii procesului se produce creşterea creatinei urinare.

Miotonia, o boală relativ rară, este caracterizată prin rigiditate musculară, relaxarea musculară instalîndu-se foarte lent, după o concentraţie voluntară. Este admis că în miotonie tulburarea fundamentală este localizată în membrana fibrei musculare. Alterarea determină incapacitatea membranei de a întrerupe, în timp util, pătrunderea ionilor de Na^+, fenomen ce se produce în cursul procesului de excitaţie.

Miastenia este caracterizată prin tendinţa musculaturii de a obosi pînă la epuizare. Pentru explicarea blocajului miastenic la nivelul sinapsei neuromusculare, sînt discutate următoarele posibilităţi:

— scăderea eliberării de acetil-colină la nivelul terminaţiei nervoase, fie prin deficitul etapelor premergătoare sintezei, fie prin inhibiţia acestui proces;

— accelerarea descompunerii acetil-colinei consecutivă intensificării activităţii colinesterazice;

— scăderea sensibilităţii plăcii terminale faţă de acetilcolină (efect acetilcolină desensibilizant) de tipul celui produs prin curara.

Paralizia paroxistică hipokalemică, afecţiune ereditară rară, caracterizată prin stări de paralizie flască, ce se produc prin crize, perponderent la nivelul musculaturii extremităţilor.

Dintre celelalte miopatii genetice mai rare, pot fi menţionate sindromul Mc. Ardle — lipsa de fosforilază; miopatiile cu depozitare de lipide cu nivel scăzut de carnitină (pînă la 20% din nivelul normal muscular), prin tulburarea sintezei carnitinei sau inhibiţiei preluării carnitinei de către musculatură. La acestea pot fi adăugate miopatiile din glicogenezele tip II, III, VII şi VIII (Cap. IX), precum şi boala mitocondrială autonomă cu fosforilare oxidativă slabă şi miopatia hipoglicolitică (Larsen).

5.2. PATOLOGIA DOBÎNDITĂ

Tulburări ale mecanismului muscular se pot produce în mai multe boli, mai bine cunoscute fiind cele determinate de disfuncţiile tiroidiene precum şi cele determinate prin bolile suprarenalei, ca de ex. boala Addison. În acest caz, adinamia este corelată cu schimbarea compoziţiei minerale a sîngelui, concentraţia ionilor Cl şi Na fiind scăzută iar aceea a ionilor K crescută.

Alte stări de carenţă de K, cu fenomene de insuficienţă musculară pot fi întîlnite în acidoza diabetică, în faza postoperatorie a afecţiunilor chirurgicale, în diareele persistente, în sindroamele cu vărsături abundente, sprue.

Scanned with OKEN Scanner

Capitolul XVIII

BIOCHIMIA SISTEMULUI NERVOS

Sistemul nervos central şi cel periferic, precum şi sistemul vegetativ-simpatic şi parasimpatic, îndeplinesc un rol capital în desfăşurarea funcţiilor întregului organism; deşi ponderal, ţesutul nervos reprezintă numai 1/40 din greutatea totală a corpului.

Sistemul nervos central primeşte, prelucrează şi conservă semnalele ce vin din exterior prin organele de simţ. Creierul intermediar — împreună cu hipofiza — realizează coordonarea pe plan superior neuro-endocrin, suprapusă mecanismelor primare de reglare a metabolismului celular. Sistemul nervos periferic transportă influxul nervos, de la centru la periferie şi reciproc. Sistemul nervos vegetativ intervine în reglarea echilibrului visceral funcţional.

Două trăsături fundamentale hotărăsc particularitatea funcţională a sistemului nervos: rapiditatea manifestării unor fenomene şi caracterul lent al altora. Astfel, viteza de propagare a influxului nervos atinge cîteva sute de metri pe secundă, iar durata excitaţiei unui nerv este de ordinul milisecundelor. În schimb, memoria este, foarte probabil, expresia unor schimbări lente şi perseverente ce se petrec în sistemul nervos central. Bazele moleculare ale acestor două trăsături nu sînt bine cunoscute, majoritatea datelor de neurobiochimie referindu-se la prima trăsătură. După Rapoport cele două trăsături alcătuiesc „contradicţia" caracteristică sistemului nervos, referitoare atît la fenomenele biochimice, cît şi la cele electrice integrate în funcţionalitatea acestui ţesut. Pe lîngă aceste două proprietăţi fundamentale cu caracter general trebuie subliniate încă alte cîteva trăsături importante privind metabolismul creierului:

— izolat prin barierea hemato-encefalică, creierul trebuie să-şi asigure sinteza unui număr mare de molecule — structurale şi funcţionale — ce se produc cu continuitate. Această barieră este totuşi permeabilă pentru glucoză, majoritatea acizilor aminaţi, baze purinice şi pirimidinice, nucleozide;

— sinteza şi catabolismul moleculelor funcţionale se efectuează într-un ritm extrem de rapid, reflectat în traseele electroencefalografice;

— există mari diferenţe regionale privind compoziţia chimică şi posibilităţile metabolice ale constituenţilor;

— metabolismul ţesutului nervos este influenţat de vîrstă. În creier nu se petrec, ca în alte organe, fenomene de regenerare sau hiperfuncţie compensatorie;

— celula nervoasă trebuie să asigure nutriţia extremităţii sale axonice, segment capital pentru funcţionalitatea sinapselor care solicită o intensă activitate metabolică.

Scanned with OKEN Scanner

În studiul metabolismului ţesutului nervos se întîmpină mari dificultăţi datorate complicatei structuri a creierului, numeroaselor sale corelaţii metabolice, vitezei şi labilităţii metabolismului său. Explorarea directă a metabolismului cerebral se face prin studii comparative, între sîngele carotidian şi cel jugular. Fluxul cerebral sanguin este investigat prin procedee de difuzie cu N_2O sau cu substanţe marcate cu radioizotopi. Caracterizările enzimometabolice se fac pe secţiuni tisulare sau pe celule izolate în culturi, precum şi prin izolarea sistemelor enzimatice prin ultracentrifugare.

Datorită vitezei mari cu care se petrec modificările biochimice în ţesutul nervos, este necesară fixarea rapidă a organului sau ţesutului prin imersare în azot lichid, înaintea aplicării procedeelor de studiu menţionate.

1. ELEMENTE STRUCTURALE ALE ŢESUTULUI NERVOS

1.1. NEURONII

Neuronii sau celulele nervoase sînt elemente de bază ale sistemului nervos. Din punct de vedere morfologic, neuronii posedă elemente ultrastructurale, comune cu toate celelalte celule — citoplasmă, nucleu, aparat Golgi, reticul endoplasmatic neted şi rugos — acesta din urmă fiind denumit şi substanţa Nissl. Posedă însă şi structuri caracteristice, adecvate funcţiei de conducere a

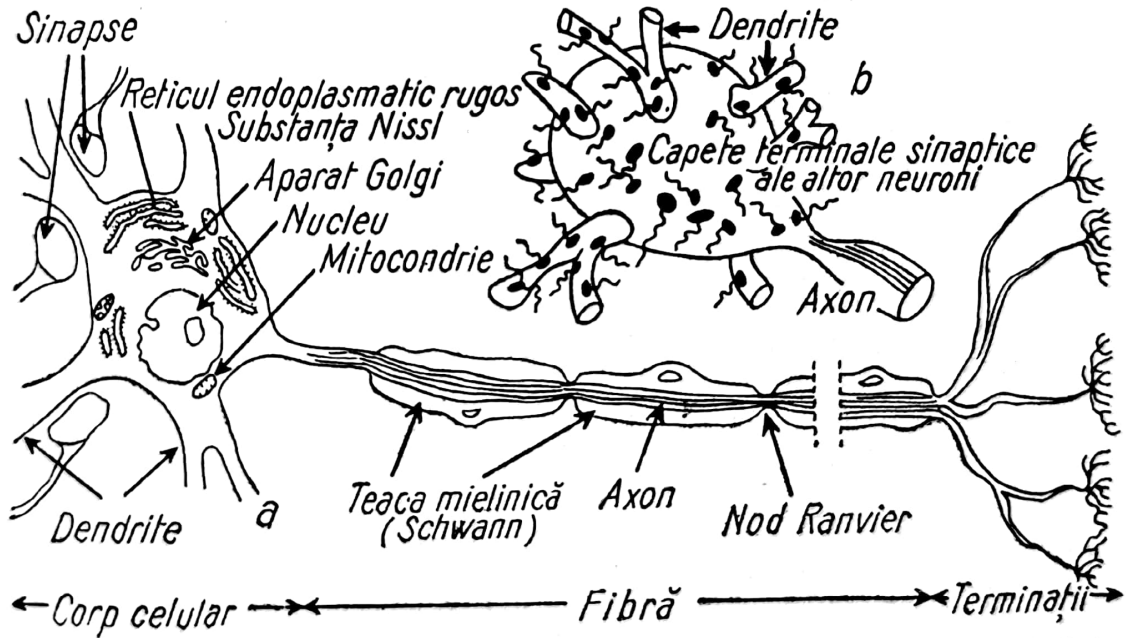


Fig. XVIII.1. a) Reprezentarea schematică plană a unui neuron cu axon mielinizat; b) reprezentarea spaţială a unui neuron izolat în contact cu capetele terminale, sinaptice, ale altor neuroni.

influxului nervos. Acestea sînt dendritele, scurte prelungiri ale corpului celular ce poartă impulsul către alţi neuroni şi axoni, prelungiri lungi ce duc impulsul nervos către neuronii vecini. La vertebrate axonul este învăluit într-o teacă de mielină (foarte bogată în lipide) ce constă din membranele celulelor Schwann ai căror nuclei se găsesc de-a lungul tecii. Este practic absentă în fibrele fine, nemielinizate ale sistemului nervos autonom (fig. XVIII. 1). Prin intermediul

Scanned with OKEN Scanner

acestor prelungiri celula nervoasă își îndeplinește funcția în preluarea, prelucrarea și transmisia informației. Neuronii sînt cele mai mari celule din organism al căror volum oscilează între 1 000 μ și 100 000 μ, iar prin prelungirile lor posedă o mare suprafață disponibilă pentru interacții metabolice. Sînt celule foarte bogate în reticul endoplasmatic, ribozomi (substanța Nissl) avînd și nucleoli mari ce sugerează o intensă activitate de sinteză proteică. O trăsătură caracteristică neuronilor este faptul că ei nu se înmulțesc și numai o parte din genomul lor este activ. Între ei sînt însă mari diferențe biochimice legate de mediatorii chimici și de structura ARN.

1.2. SINAPSELE

Axonul și dendritele îngroșate în partea lor terminală vin în contact cu suprafața celulară a altui neuron. Aria de contact are o structură specială *denumită sinapsă*, corespunzînd unor joncțiuni interneuronale, centrale sau periferice sau de tipul plăcii terminale prin care se face legătura între neuronii motori și mușchi. Sinapsele centrale reprezintă punctele nodale ale vastei rețele tridimensionale din creier.

Transmisia excitației la nivelul sinapselor interneuronale sau al plăcii terminale din miofibrile se bazează pe liberarea substanțelor chimice, denumite neurotransmițători sau mediatori chimici ai transmisiei, asupra cărora se va reveni. În mulți neuroni mediatorii chimici sînt depozitați în veziculele capătului presinaptic al terminațiilor nervoase. Cînd influxul nervos atinge domeniul sinaptic al axonului, impulsul poate trece mai departe în momentul

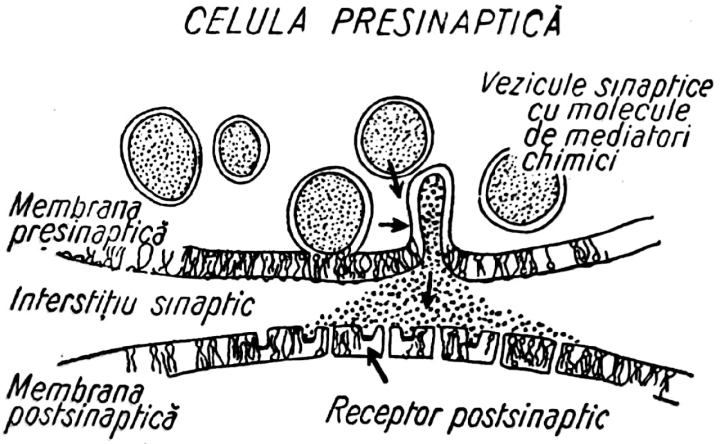


Fig. XVIII.2. Reprezentarea schematică a membranelor pre- și postsinaptice, cu eliberarea neuro-transmițătorilor chimici.

în care membrana postsinaptică devine permeabilă pentru curentul ionic prin liberarea mediatorilor chimici (fig. XVIII. 2). Un nerv este alcătuit de obicei dintr-un fascicul de mai mulți neuroni.

1.3 CELULELE GLIALE

Acestea îndeplinesc funcția de susținere, apărare și nutriție a neuronului. Se înmulțesc rar și nu participă la transmisia curentului nervos. Sînt bogate în lipoproteine și transformă rapid ARN. Din această categorie fac parte

Scanned with OKEN Scanner

celulele Schwann care intră în teaca ce îmbracă axonul nervilor periferici cît şi astrocitele. Cantitativ, 20% din masa cerebrală este reprezentată şi prin elemente conjunctive alcătuite din proteoglicani şi proteine structurale.

2. COMPOZIŢIA ŢESUTULUI NERVOS

Nu se poate vorbi de o compoziţie unitară a ţesutului nervos. Astfel în creier, împărţirea în mare a substanţei cerebrale în albă şi cenuşie corespunde şi unor diferenţe cunoscute în planul molecular de organizare, care apare chiar şi între variatele zone funcţionale ale substanţei cenuşii. În cortexul cerebral, sînt diferenţe chimice între straturi. În tabelul XVIII.1, sînt redate valori orientative, referitoare la diferenţele de compoziţie dintre substanţa albă şi cea cenuşie.

Tabelul XVIII.1

Diferenţele de compoziţie dintre substanţa albă şi substanţa cenuşie

Component	Substanţa cenuşie %	Substanţa albă %
Apă	83—87	68—74
Proteine	8—12	9—12
Lipide	5—13	17—37
Minerale	1— 2,6	2— 2,7

Se remarcă conţinutul procentual mai ridicat al apei din substanţa cenuşie şi valoarea relativă a concentraţiei lipidelor, de cca 3 ori mai mare în substanţa albă.

2.1. ELECTROLIŢII

Concentraţia ionică în celula nervoasă este dependentă de cea din lichidele interstiţiale, care stabilesc legătura dintre sînge, lichidul cefalo-rahidian (l.c.r.) şi neuroni. Bariera hematoencefalică, prin permeabilitatea sa selectivă, exercită o triere a moleculelor şi ionilor care o traversează. Concentraţia anionilor în creier este mai mică decît aceea a cationilor, raportul fiind 75 vali* anioni/166 vali cationi. Clorul are o concentraţie de numai 75 vali/g de ţesut cerebral, în timp ce în l.c.r. concentraţia atinge 127 vali/ml, mai ridicată deci decît în plasmă (107 vali/ml). Se presupune că excesul de cationi ar fi anihilat prin combinaţia lor cu fosfatidele. Fosfatidilserina ar lega 16% din K^+ şi 20% din Na^+; difosfoinozitidele, 50% din Ca^{++} şi Mg^{++}, iar sulfatidele 12% din K^+. În acest mod indirect, fosfatidele ar interveni în activitatea funcţională a ţesutului nervos, prin acţiunea lor asupra concentraţiei cationilor cu rol important în realizarea potenţialului de membrană şi în transmisia impulsului nervos.

* 1 val=1 mili Eq.

Scanned with OKEN Scanner

2.2. LIPIDELE

În general, ţesutul nervos are cel mai ridicat conţinut lipidic dintre toate ţesuturile din organism, atingînd nivelul de 50—54% din greutatea sa uscată. Fosfolipidele sînt preponderente în raport cu celelalte lipide. În tabelul XVIII. 2 este înscrisă compoziţia lipidică, diferenţială, între substanţa albă şi substanţa cenuşie în comparaţie cu nivelul plasmatic al lipidelor.

Tabelul XVIII.2

Diferenţa de compoziţie lipidică dintre substanţa albă şi substanţa cenuşie, comparativ cu nivelul plasmatic al lipidelor

Substanţe	% din greutatea umedă		
	Substanţă cenuşie	Substanţă albă	Plasmă
Lipide totale	5,9	19,0	0,4—0,7
Colesterol	1,0	4,0	0,05—0,09
Steride	—	0,05	0,12—0,18
Glicerolipide			
Trigliceride	0,03	0,11	0,07—0,17
Acizi fosfatidici	—	0,05	—
Lecitine	1,1	1,4	—
Fosfatidil-etanolamine	0,6	0,4	—
Fosfatidil-serine	0,6	1,5	0,15—0,25
Cefaline β	0,2	0,5	—
Plasmalogene	0,7	3,3	—
Fosfo-inozitide	0,15	0,3	—
Sfingolipide			
Sfingomieline	0,3	1,3	—
Cerebrozide	0,3	3,8	0,004—0,006
Sulfatide	0,2	1,2	—
Gangliozide	0,3	0,5	—

Lipidele din substanţa albă — care participă la formarea tecilor de mielină — au o compoziţie relativ aparte, ce le deosebeşte de celelalte ţesuturi. Conţin foarte puţine steride şi aproape deloc trigliceride (cele mai abundente lipide în alte ţesuturi). Partea principală aste alcătuită din fosfolipide, de diferite feluri şi din derivaţi de sfingozină fără fosfor. Conţinutul în colesterol este ridicat în substanţa albă (tabelul XVIII. 3).

Tabelul XVIII.3

Distribuţia lipidelor în ţesutul nervos (procente din masa uscată)

Substanţă totală uscată	Substanţă cenuşie	Substanţă albă
Lipide totale	35,1	61,2
colesterol	5,1	13,8
cerebrozide	4,2	16,0
fosfolipide	20,4	26,5
lecitine	7,3	5,7
cefaline	11,3	17,1
sfingomieline	1,8	3,7
digliceride	1,1	—

Scanned with OKEN Scanner

Lipidele cerebrale au mai ales un rol structural şi nu par să fie folosite ca substrat energetic. Multe dintre ele sînt asociate cu proteinele, iar altele cu glucidele. Proteolipidele, insolubile în apă, există sub trei forme (A, B, C) diferite prin conţinutul lor lipidic. Lipoproteinele solubile în apă intră în constituţia tecii mielinice. Glicolipidele se găsesc, în special, în substanţa albă sub formă de cerebrozide, gangliozide şi strandină. Diferitele variaţii de lipide sînt sintetizate de celulele ţesutului nervos. Anumite fosfolipide pot traversa bariera hemato-encefalică trecînd în l.c.r.

2.3. PROTEINELE

Acestea reprezintă în ansamblu 40% din greutatea uscată a creierului. Sînt alcătuite din trei fracţiuni diferite:

(a) *O fracţiune hidrosolubilă,* comună cu alte ţesuturi, la care se adaugă proteine specifice ţesutului nervos. Dintre acestea pot fi menţionate:

— *cerebrocupreina* cu greutate moleculară 35 000 daltoni, purtătoare a doi atomi de cupru;

— *proteine fibroase,* unele asemănătoare colagenului şi

— *o proteină foarte acidă,* bogată în acizi aminaţi dicarboxilici (descrisă de Moore) cu greutate moleculară de 20 000 daltoni.

(b) *Proteinele din formaţiile membranoase,* solubile în solvenţi polari. Printre acestea se găsesc proteolipidele mielinice. Au un conţinut ridicat de aminoacizi hidrofobi şi aromatici. În cantitate mare se găseşte o proteină bazică, ce prin injectare produce fenomene inflamatorii şi degenerative, denumită proteina encefalitogenă. Se presupune că ea joacă un rol şi în geneza sclerozei în plăci.

c) *O proteină reziduală* (după extracţia apoasă şi organică) denumită *neurocheratină,* numai pe baza caracterului de rezistenţă la acţiunea enzimelor, comun cu al cheratinei, faţă de care nu are nici o asemănare din punct de vedere chimic. Este deosebit de abundentă în substanţa albă, tecile de mielină şi neuroglie.

În ultimii ani s-a abordat studiul *fundamentului molecular al memoriei,* legîndu-l de metabolismul ARN şi sinteza proteinelor. Există tendinţa de a apropia — ca mecanism de producere — fenomenul de memorizare de acela al producţiei de anticorpi. S-a emis o ipoteză conform căreia influxul nervos acţionează direct asupra sistemului de reglare a biosintezei proteinelor. Influxul nervos ar induce sinteza de ARN mesager a unei proteine de „memorie" al cărei rol ar fi de a facilita anumite conexiuni sinaptice, cu determinarea de noi circuite în sistemul nervos. Grupările funcţionale polare ale proteinelor cerebrale, în contact cu faza apoasă interstiţială şi împreună cu ionii vehiculaţi de aceasta, ar juca un rol esenţial pentru menţinerea oscilaţiilor electrice caracteristice stării de conştienţă, constituind substratul „memoriei efemere". Un alt fenomen interesant în care proteinele cerebrale ar juca un rol important, cu perspectivă de aplicare în practica medicală este acela al anesteziei prin substanţe chimice inerte (argon, xenon). Aceste substanţe ar conduce la formarea unor microcristale, ce ar fi stabilizate prin prezenţa proteinelor cerebrale. Formarea cristalelor ar modifica din impedanţa* sistemului oscilator cerebral, care se

* Sistemul oscilator al curenţilor electrici cerebrali este asimilat cu un circuit electric alternativ. Impedanţa este raportul dintre tensiunea eficace (la borne) şi intensitatea eficace a curentului. Se măsoară în ohmi.

Scanned with OKEN Scanner

reflectă atît în variaţiile traseului electric, cît şi în pierderea conştienţei (ca efect al anesteziei generale).

Sinteza proteinelor nervoase (studiată prin metode chimice şi radioizotopice) se consideră că este foarte intensă în substanţa cenuşie, mai mult decît în cea albă, realizîndu-se în special în substanţa Nissl (ribozomi). S-a arătat că încorporarea aminoacizilor marcaţi este foarte activă; viteza de reînnoire a proteinelor corespunde celei aflate la nivelul ficatului. O parte din proteine rămîne în neuroni iar o alta ajunge în prelungiri (flux axonic), Această sinteză se desfăşoară rapid în cursul dezvoltării embrionare fiind stimulată de tiroxină, efect ce nu se produce şi în creierul adult datorită barierei hemato-meningee pentru tiroxină.

2.4. ALŢI COMPUŞI AZOTAŢI

Substanţa cerebrală conţine glutation (80 mg% ţesut), alte oligopeptide acide şi fosfopeptide, cărora li s-ar putea atribui un rol în transportul activ prin membranele celulare. Dintre fosfopeptide, unele asociate prin legătură ester cu fosfoinozitidele formează aşa-numitele fosfatide Folch-Pi, Le Baron.

2.4.1. AMINOACIZII

Se găsesc în ţesutul nervos în cantitate apreciabilă. Cei liberi împreună cu cei ce intră în structurile proteice, reprezintă 40% din greutatea ţesutului uscat iar concentraţia celor liberi este de opt ori mai mare decît cea plasmatică. Repartiţia calitativă şi cea cantitativă a unora dintre ei este caracteristică ţesutului cerebral. Aminoacizii cei mai răspîndiţi în creier sînt: acidul N-acetil-aspartic (care nu există în plasma normală), acidul glutamic, glutamina, acidul aspartic, taurina şi acidul gama-aminobutiric, a cărui concentraţie de 80 μ moli/g ţesut este de trei sute de ori mai mare decît cea plasmatică. Acidul glutamic este sintetizat (local) prin transaminarea acidului α-cetoglutaric, produs prin metabolizarea glucozei, sau provine din glutamina plasmatică, ce poate trece liberă prin bariera hematoencefalică. Merită subliniat faptul că acidul glutamic este singurul aminoacid care măreşte respiraţia cerebrală, în prezenţa sau în absenţa glucozei. Transaminarea acidului glutamic se realizează, în special, cu acidul oxalacetic, fapt ce poate explica concentraţia ridicată a acidului aspartic şi a derivatului său N-acetil în ţesutul cerebral. Decarboxilarea acidului glutamic produce acidul γ-aminobutiric (GABA), ambii jucînd un rol metabolic deosebit de important în ţesutul nervos (care va fi expus mai departe).

2.4.2. ACIZII NUCLEICI ŞI SUBSTANŢELE ÎNRUDITE

Se găsesc în concentraţie ridicată în ţesutul nervos, aspect corelat cu sinteza foarte activă a proteinelor. Precursorii direcţi ai ARN adică nucleotizii trifosforilaţi (NTP) se găsesc în concentraţie crescută în creier (189 μ moli/100 g ţesut proaspăt); în special în substanţa cenuşie unde raportul NTP/ARN este ridicat. Nucleozidtrifosfatul cel mai abundent este desigur ATP. În ordinea descrescîndă de concentraţie se găsesc şi nucleozid-difosfaţii, în special UDP unit cu diferite oze; şi nucleozid monofosfaţii (AMP), în urme.

Scanned with OKEN Scanner

Este de subliniat creşterea nucleotizilor paralel cu dezvoltarea filogenetică precum şi scăderea nivelului lor în hipoxie, fără a se putea da încă o explicaţie exactă acestor modificări.

2.4.3. NUCLEOPROTEINELE

Rezultate din combinaţia acizilor nucleici cu proteinele, sînt în cea mai mare parte asociate în substanţa cerebrală cu lipidele, sub formă de liponucleoproteine. Dezoxiribonucleoproteinele se găsesc desigur în nucleii celulelor nervoase iar ribonucleoproteinele în nucleoli şi citoplasmă. Conţinutul în ARN a fost propus ca indicator al stării funcţionale a neuronului. Cantitatea de ADN, deşi redusă, este suficientă pentru a asigura sinteza proteinelor şi a m-ARN-ului corespunzător. Se fac — după cum s-a mai menţionat — interesante ipoteze de corelare a memoriei de lungă durată cu acizii nucleici, ca substrat al acesteia şi al procesului de învăţare, dar nu se cunosc precis şi demonstrativ fapte indubitabile în această privinţă. Se încearcă să se stabilească o corespondenţă între memoria genetică, manifestată prin transmisia mesajului genetic şi fenomenul mintal de înregistrare a memoriei (pe termen lung). Deocamdată nu se poate găsi decît o corespondenţă analogică, formală, mai ales de expresie şi nu de substrat chimic. Experienţele de transmisie a memoriei (Ungar) prin injecţie sau ingestie de ARN sînt criticabile şi prin faptul că, atît acest acid, cît şi alţi nucleotizi nu pot traversa bariera hematoencefalică.

2.5. GLUCIDELE

În ţesutul nervos glucidele sînt reprezentate prin glucoză şi glicogen, Ambele se găsesc în concentraţie relativ mică. Glucoza reprezintă singurul substrat energetic utilizat în ţesutul cerebral. De altfel, 2/3 din consumul de glucoză a organismului în repaus se realizează în creier. Cea mai mare parte din glucide (5/6) sînt oxidate aerob, cu o viteză foarte mare. Scăderea glicemiei sub o anumită limită afectează funcţia cerebrală. Glucoza se găseşte sub formă de esteri fosforici. Glicogenul nu constituie o substanţă de rezervă pentru ţesutul nervos şi — aşa cum s-a apreciat — se află în concentraţie foarte mică (70—130 mg%). Galactoza se găseşte de asemenea în nervi în concentraţie mică.

2.6. ENZIMELE

Ţesutul nervos conţine toate enzimele implicate în principalele căi metabolice (capitolele IX, X, XI). Menţiune specială trebuie făcută pentru cîteva din enzimele corelate cu activitatea specifică a ţesutului nervos sau numai cu aceea a creierului.

Glutamat dehidrogenaza şi glutamin-sintetaza apar în concentraţii mari în creier. Sinteza acetilcolinei şi glutaminei necesită prezenţa de ATP şi ATP-ază, care desface una din legăturile fosfat-macroergice. Cea mai ridicată activitate ATP-azică este în neuroglie. În neuroni, 25% din această activitate este localizată în membrana celulară.

Ca organ mare consumator de oxigen, creierul posedă un puternic aparat mitocondrial, bogat în sistem succinoxidazic. Substanţa cenuşie are o activi-

Scanned with OKEN Scanner

tate respiratorie de 4—5 ori mai mare decît a substanţei albe sau a nervilor periferici. Celulele nervoase conţin ARN-polimerază, foarte activă, într-o concentraţie care depăşeşte pe aceea a altor ţesuturi. Alte două enzime, colinesteraza şi colinacetilaza, sînt prezente şi strîns corelate cu activitatea funcţională a ţesutului. Creierul conţine şi o glutation-reductază, foarte activă, ca şi amilaza (care se consideră că ar hidroliza glicogenul pînă la maltoză). Carbonicanhidraza prezentă în creier ar avea un rol în reglarea echilibrului acido-bazic.

2.7. VITAMINELE

Vitaminele corelate cu metabolismul sistemului nervos cerebral sînt: tiamina, acidul nicotinic, vitamina B_6 şi vitamina B_{12}, acidul pantotenic şi riboflavina (descrise în cap. XX). Menţiune specială se poate face pentru piridoxină, vitamina B_6, coenzima implicată în metabolismul acidului glutamic, substanţă cu funcţie capitală în ţesutul cerebral. De asemenea, acidul pantotenic — component structural al coenzimei A — ia parte la sinteza acetilcolinei.

2.8. MEDITATORII CHIMICI

Aceştia sînt substanţe care „mediază" transferul influxului nervos, de la un neuron la altul. După liberarea lor la nivelul terminaţiilor nervoase şi al membranelor sinaptice, aceste substanţe difuzează către membrana postsinaptică (v. fig. XVIII.2). Liberarea mediatorilor se face prin emiocitoză (revărsare), posibil şi prin difuziune, în interstiţiul sinaptic şi necesită prezenţa ionilor de Ca^{++}. Pe fiecare impuls se liberează oscilant 10^7 molecule, care se leagă probabil de receptori (necunoscuţi încă) de pe membrana postsinaptică. După trecerea impulsului mediatorii sînt degradaţi enzimatic în interstiţiu. Acţiunea mediatorilor este supusă anumitor reguli (J. P. Schade, 1969) şi anume:

— toate terminaţiile presinaptice ale unui neuron conţin acelaşi mediator;

— doi neuroni în circuit (unul după altul) pot să conţină mediatori diferiţi;

— mediatorul eliberat în timpul excitaţiei în spaţiul interstiţiului sinaptic, este descompusrepede prin acţiuni enzimatice, localizate în formaţii pre- sau postsinaptice sau chiar în peretele interstiţiului. După cum se ştie, se cunosc sinapse centrale în creier şi sinapse periferice. O sinapsă de tip special este aceea dintre nervii motori şi muşchi. Observaţiile care au condus la cunoştinţele referitoare la mecanismul sinaptic, se bazează mai ales pe modele simple şi studii făcute asupra sinapselor periferice.

Din categoria mediatorilor chimici fac parte următoarele substanţe: acetilcolina, adrenalina, noradrenalina, dopamina, aminele biogene ca serotonina şi histamina, aminoacizi ca glicina, glutamina, acidul γ-aminobutiric (GABA). Modul de intervenţie al semnalelor transmise prin mediatori nu este încă complet elucidat.

În sinapsele periferice sînt reprezentate două sisteme, caracterizate prin natura mediatorilor chimici:

— transmisia mediată prin acetilcolină sau transmisia colinergică;

— transmisia mediată prin noradrenalină, denumită adrenergică.

Scanned with OKEN Scanner

În sistemul nervos central acţionează şi ceilalţi mediatori: dopamina, serotonina, histamina, GABA, glicocolul şi glutamatul, prezenţi în creier nu numai ca metaboliţi intermediari, ci şi ca mediatori.

2.8.1. ACETILCOLINA

Este prima substanţă căreia i s-a atribuit calitatea de mediator chimic. Neuronii ale căror terminaţii liberează acetilcolină sînt denumiţi colinergici. Acetilcolina este liberată în urma unui stimul nervos, la nivelul terminaţiilor nervoase preganglionare ale sistemului nervos simpatic şi al celui parasimpatic, la nivelul fibrelor postganglionare parasimpatice şi în anumite cazuri şi ale celor simpatice. Se liberează de asemenea şi la nivelul terminaţiilor nervilor motori ai scheletului. Ea există în ţesutul nervos sub formă inactivă legată de o proteină, în vezicule sau chiar în interiorul membranei excitabile după Nachmanson. Din momentul trecerii sale din forma inactivă (legată de proteină) în starea activă urmată de liberarea sa, acetilcolina este hidrolizată rapid prin acţiunea acetilcolinesterazei. Aproape simultan ea este resintetizată prin acţiunea colinacetilazei (sau a colinacetat-transferazei), în prezenţă de ATP, Mg^{++} şi acetil CoA (agentul de acetilare al colinei).

2.8.2. L-NORADRENALINA

Este mediatorul chimic produs de terminaţiile neuronilor adrenergici. Împreună cu adrenalina şi dopamina formează grupul de catecolamine, derivate din tirozină. Noradrenalina este inactivată pe loc sub acţiunea monoaminoxidazei (MAO), sau prin reacţii de metilare. Prin acest ultim mecanism, în prezenţa S-adenozil-metioninei şi a catechol-O-metiltransferazei, noradrenalina produce normetanferină şi acid vanilmandelic. Aceşti compuşi metoxilaţi se înrudesc cu mescalina (trimetoxi-3, 4, 5-feniletilena) substanţă psihomimetică halucinantă. Observaţia a determinat ipoteze că anumite afecţiuni mintale (schizofrenia) ar putea fi corelate cu exacerbarea procesului de O-metilare. În urina schizofrenicilor se găseşte dimetoxi-3, 4-feniletilamină.

În biosinteza adrenalinei, dopamina reprezintă precursorul său nemijlocit. Inactivarea dopaminei se face prin MAO şi COMT (catechol-O-metiltransferaza).

2.8.3. DOPAMINA

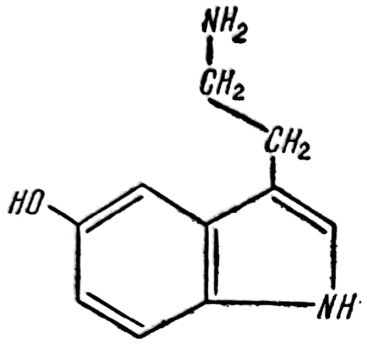
Funcţionează ca neurotransmiţător în zonele din creier, în care se găseşte o cantitate foarte mică de dopamin β-hidroxilază. Acţiunea sa pare legată de transmisia excitaţiei în neuronii motori. Scăderea concentraţiei dopaminei în putamen şi nucleul caudat din creier, este un „semn biochimic" important în boala Parkinson. Tratamentul cu L-dopa, aplicabil în această boală, se bazează pe constatarea că această substanţă traversează bariera hematoencefalică şi ajunsă în creier determină creşterea nivelului de dopamină, favorizînd dispariţia manifestărilor parkinsoniene.

2.8.4. SEROTONINA (5-HIDROXITRIPTAMINA)

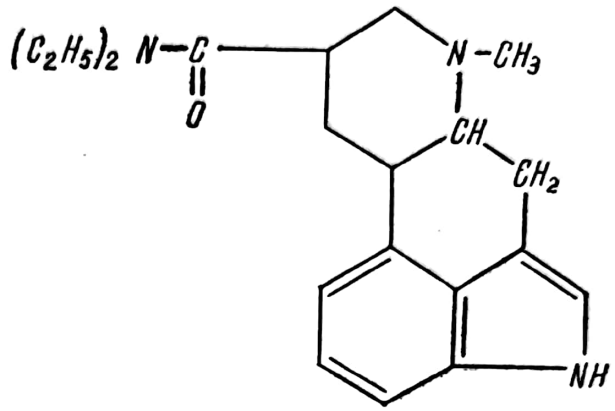
Se găseşte în anumite regiuni ale creierului, anume în hipotalamus, Area Postrema, în substanţa cenuşie centrală. Distribuţia şi variaţiile sale

Scanned with OKEN Scanner

în creier sînt apropiate de acelea ale adrenalinei. Rolul său nu este bine cunoscut. Nivelul substanţei scade în sistemul nervos central sub acţiunea medicamentelor depresive şi creşte în administrarea antidepresivelor (iproniazida şi alţi inhibitori ai monoaminoxidazei). Puternicul drog halucinant „LSD" (amida acidului lisergic) are o structură parţial asemănătoare cu aceea a serotoninei, după cum reiese din formulele:



Serotonină



LSD

2.8.5. GABA ŞI ALŢI AMINOACIZI

GABA (acid γ-aminobutiric) este un neuromediator al sistemului nervos central, sintetizat printr-o reacţie piridoxalfosfat dependentă, din glutamat. După natura acţiunii lor, în sistemul nervos central mediatorii chimici pot fi împărţiţi în două grupe: excitatori şi inhibitori. Catecholaminele sînt prototip de mediatori de excitaţie, pe cînd GABA este prototip de mediator de inhibiţie.

Glutamatul este excitator în scoarţa cerebrală şi măduva spinării, iar glicina este inhibitor al sinapselor interneuronale din măduvă. Variaţiile de concentraţie ale mediatorilor au importanţă pentru ritmicitatea dintre somn şi starea de veghe.

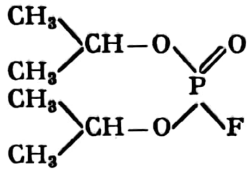
3. ELEMENTE DE FARMACOLOGIE BIOCHIMICĂ A MEDIATORILOR CHIMICI

Numeroasele procese ce se petrec în transmisia chimică a influxului nervos alcătuiesc un domeniu de mare perspectivă al farmacologiei biochimice. Cîteva exemple ilustrează această afirmare. Utilizarea analogilor sintetici de substraturi duc la inhibiţii dirijate: α-metiltirozina inhibă formarea catecholaminelor iar p-cloranilina pe aceea a serotoninei. O modalitate de creştere a acţiunii unui mediator este inhibiţia procesului său de distrugere la nivelul sinapsei. În acest mod acţionează inhibitorii monoaminoxidazei. Un alt punct de intervenţie este la nivelul veziculelor de depozitare sinaptice. Rezerpina, alcaloid utilizat în tratamentul hipertensiunii arteriale, determină golirea veziculelor sinaptice de conţinutul lor în serotonină, noradrenalină, dopamină. Scăderea noradrenalinei în creier determină o stare depresivă. Stările depresive se tratează în schimb prin inhibitori ai MAO. Se poate

Scanned with OKEN Scanner

acţiona şi asupra receptorilor pentru mediatori, cu scăderea excitaţiei (ex. prin fenotiazină) sau creşterea ei (ex. amfetamină).

O inhibare ireversibilă a acetilcolinesterazei se obţine prin alchili-fosfaţi, ca de ex. diizopropilfluorofosfatul:



Inhibarea enzimei duce la o acţiune intensă şi de lungă durată a acetilcolinei şi deci a excitaţiei parasimpatice. Compuşii organo-fosforici, în general, se leagă covalent la grupul β-hidroxil al unui rest seril din centrul activ al enzimei. DFP este unul din cei mai activi inhibitori enzimatici cunoscuţi. O serie de insecticide cît şi anumite „arme chimice" de luptă aparţin inhibitorilor colinesterazei.

Atropina este folosită ca antidot în intoxicaţiile cu alchil-fosfaţi. Acest alcaloid blochează acţiunea acetilcolinei la transmisia din neuronul postganglionar în organul efector (musculatura netedă), dar nu şi transmisia din neuronul preganglionar către cel postganglionar. Se cunosc şi halucinogene, derivaţi de atropină, care blochează acţiunea acetilcolinei la capetele terminale ale fibrelor postganglionare.

4. METABOLISMUL SISTEMULUI NERVOS

Procesele energetice respiratorii sînt preponderente în sistemul nervos. Creierul consumă 20—25% din totalul de oxigen utilizat de organismul întreg în stare de repaus. Consumul de oxigen pe gram de ţesut cerebral este de 20 de ori mai mare decît al muşchiului. Substanţa cenuşie are un consum de oxigen mai intens decît substanţa albă. Nevoia de oxigen a nervilor este doar cu puţin mai mică decît a creierului. Cotientul respirator al creierului este aproximativ 1, corespunzător unui consum aproape exclusiv de hidraţi de carbon. De altfel, glucoza este cel mai important substrat energetic al creierului; glucozo-dependenţa fiind o caracteristică metabolică a creierului. Hipoglicemia tulbură funcţiile cerebrale pînă la pierderea conştienţei, cu posibilitatea instalării unor disfuncţii ireversibile. Preluarea glucozei este practic independentă de insulină şi reglată prin oferta arterială de glucoză. Diferenţa arteriovenoasă a glucozei — în condiţii normale — este de 10,3 mg/100 ml sînge. Din această cantitate 8,9 mg glucoză sînt degradate pînă la CO_2 şi H_2O iar restul pînă la lactat (1,2 mg/100 ml sînge) şi piruvat (0,2 mg/100 ml sînge).

În condiţii de înfometare, creierul începe să se comporte ca muşchii scheletici, adică utilizează ca substrat energetic, corpii cetonici. Concomitent scade preluarea glucozei din sînge şi majoritatea din cea existentă în creier (63%) este arsă pe calea glicolitică anaerobă.

Căile de degradare ale glucozei în creier trec prin etapa glicolitică Embden-Meyerhoff 15% cu formare de acid lactic şi prin etapa ciclului acizilor tricarboxilici, 85% cu ardere pînă la CO_2 şi H_2O. Concomitent cu ambele etape, energia de oxidare se depozitează ca în toate ţesuturile, în legături

fosforice macroergice din ATP (vezi capitolul privind metabolismul glucidic). Un grup de mecanisme dinamice din sistemul nervos central sînt corelate cu metabolismul acidului piruvic. Catabolizarea acestuia prin sistemul piruvat-oxidază furnizează o bună parte din energia depozitată în legăturile macroergice. Degradarea acidului piruvic, prin decarboxilare oxidativă, este dependentă de tiaminpirofosfat, de acidul lipoic şi CoA. Se produce în acest fel acetil-CoA, donator indispensabil de grupare acetil în sinteza acetilcolinei.

Deosebit de importante pentru funcţionalitatea sistemului nervos sînt următoarele trei aspecte ale metabolismului azotat:

4.1. SINTEZA ŞI DEGRADAREA ACETILCOLINEI

Aceasta este redată schematic în fig. XVIII.3. Acetilcolinesteraza este prezentă nu numai la nivelul sinapselor, ci este răspîndită în întreaga fibră nervoasă. Este fundamental deosebită de pseudocolinesteraza plasmatică, sintetizată în ficat şi indicator plasmatic folosit în semiologia de laborator pentru explorarea sindromului hepatopriv. Desfacerea acetilcolinei este un proces exergonic iar sinteza prin colinacetilază este endergonică. Ea nu poate folosi decît acetatul activat (acetil CoA), ce se formează printr-o reacţie tiokinazică, ATP dependentă. Aceste caracteristici reacţionale au condus pe Nachmanson la elaborarea teoriei chimice a transmisiei influxului nervos (prezentată mai departe) prin opoziţie cu teoria neuroumorală.

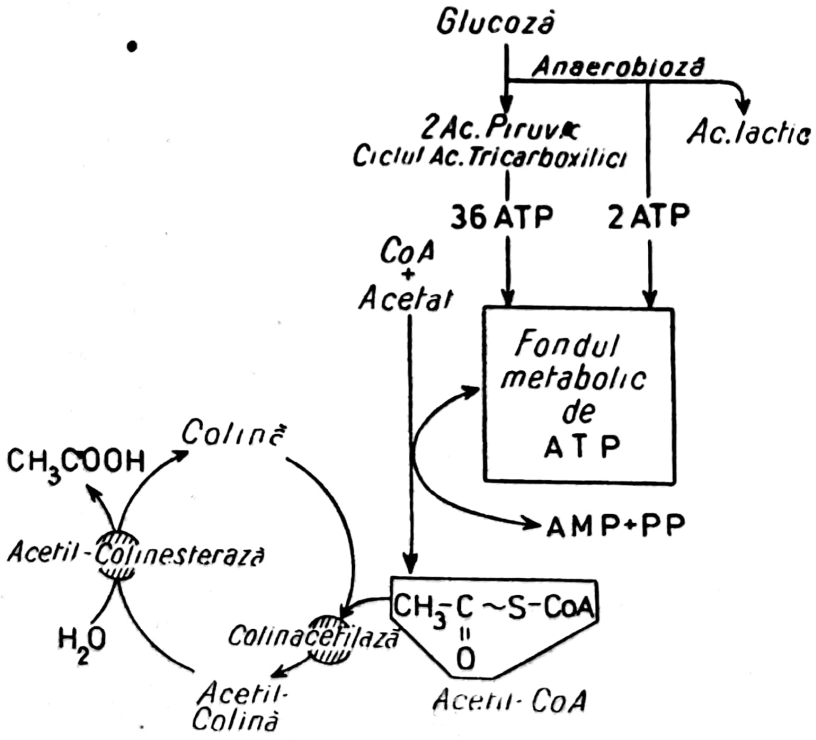


Fig. XVIII.3. Sinteza şi degradarea acetilcolinei.

4.2. ŞUNTUL GABA

Acidul γ-aminobutiric este sintetizat printr-o reacţie de decarboxilare a L-glutamatului, pirodoxalfosfat dependentă. Enzima există în două forme:

una preponderentă în neuroni şi celulele gliale, iar cealaltă în diferite ţesuturi, în special în corticala renală. GABA este transformat în succinil semi-aldehidă, prin acţiunea unei transaminaze specifice. Succinil-semialdehida

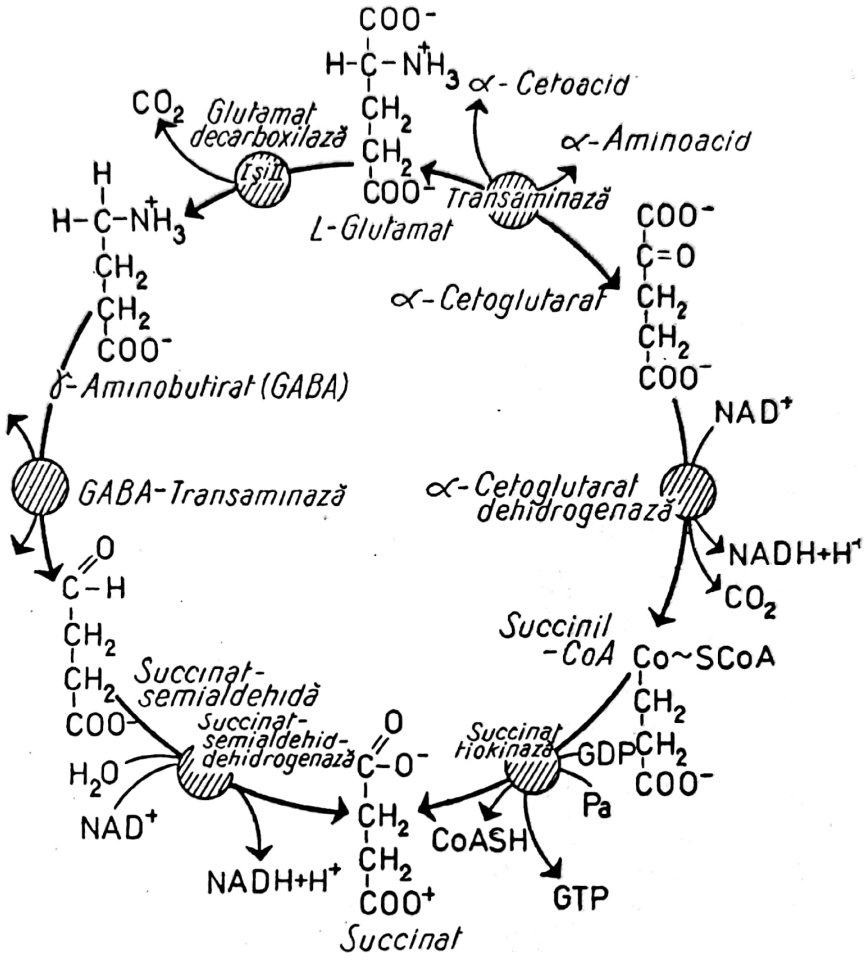


Fig. XVIII.4. Şuntul GABA.

este oxidată ulterior în acid dicarboxilic (succinic). Deoarece prin aceste reacţii este ocolită reacţia intramitocondrială a α-cetaglutaratdehidrogenazei, mecanismul este denumit „şuntul GABA". Semnificaţia biologică a acestuia nu este încă elucidată. Este acceptat însă faptul că GABA funcţionează ca mediator chimic la anumite sinapse inhibitorii, în special din domeniul ganglionilor bazali (fig. XVIII.4).

4.3. METABOLISMUL ACIDULUI GLUTAMIC ŞI AL GLUTAMINEI

Acidul glutamic este un compus extrem de reactiv care trecut sub formă de glutamină — componentă de rezervă mai puţin reactivă — este implicat într-un mecanism de reglare a proceselor metabolice în ţesutul cerebral. În creier sînt prezente şi active atît sistemele enzimatice necesare sintezei şi degradării acestui aminoacid, cît şi acelea ce pot asigura interreacţiile sale metabolice cu glucidele, lipidele şi protidele. Transformările sînt redate în schema XVIII.5.

Scanned with OKEN Scanner

Glutamat-dehidrogenaza din țesutul cerebral transformă acidul glutamic în acid iminoglutaric. La un nivel foarte scăzut al amoniacului țisular, acidul α-iminoglutaric produce spontan acid α-cetoglutaric. Prin acest mecanism

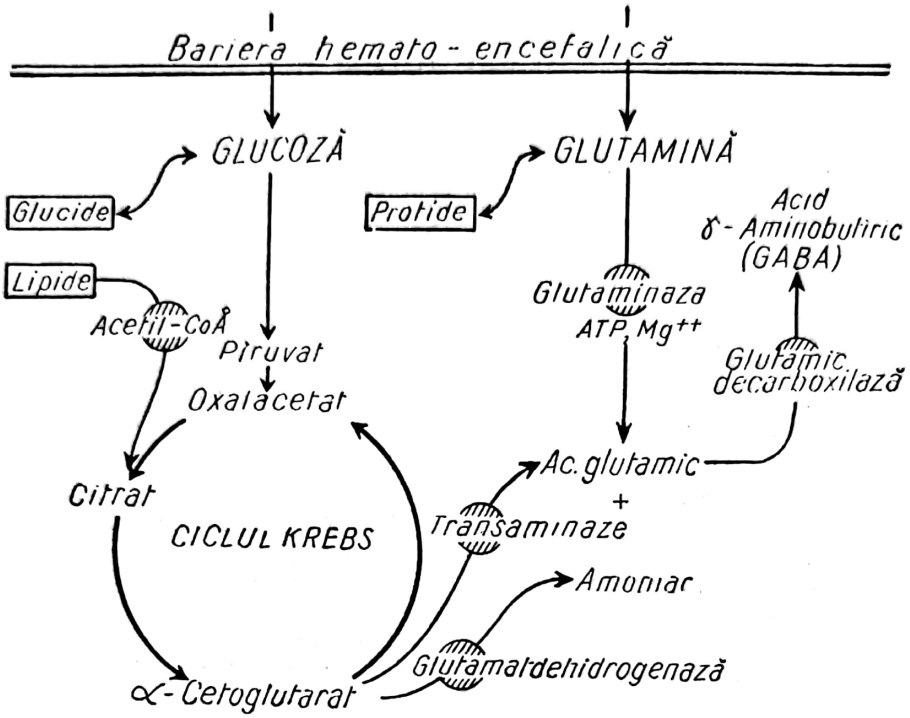


Fig. XVIII.5. Metabolismul acidului glutamic în creier.

cît și prin acela al transaminării, acidul glutamic ar putea înlocui, într-o oarecare măsură, glucoza în procesul respirator, alimentînd ciclul acizilor tricarboxilici cu acid α-cetoglutaric.

Sistemul glutamină—acid glutamic joacă un rol deosebit de important pentru reglarea metabolismului amoniacului (toxic nervos) în sistemul cerebral, conform reacției:

$$\text{acid glutamic} + NH_3 \rightleftharpoons \text{glutamină}$$

5. TRANSMISIA IMPULSULUI NERVOS

Activitatea sistemului nervos este asociată, atît cu fenomene electrice, cît și cu procese biochimice, interdependente. Sînt aspecte de o deosebită importanță ce se referă la excitabilitate, membrane excitabile — în general — generarea potențialului și a curentului de acțiune, precum și la modul de transmisie al semnalelor, interneuronal și către organul efector.

5.1. EXCITABILITATE. POTENȚIAL DE MEMBRANĂ

În sensul cel mai larg al noțiunii, excitabilitatea este capacitatea unei formații biologice (celula, de exemplu) de a reacționa față de un stimul. Condiția de bază a excitabilității unei celule este existența unei diferențe de potențial — denumită potențial de membrană — stabilită între interiorul celulei și lichidul extracelular înconjurător. În stare de repaus, potențialul

de membrană corespunde la cca 70 mV. Cauza potenţialului de repaus al membranei este repartiţia inegală a ionilor purtători de sarcini electrice; în special al celor de K^+, de o parte şi de cealaltă a membranei. O caracteristică a tuturor celulelor — inclusiv a neuronilor — este concentraţia ridicată de K^+ şi nivelul scăzut al Na^+ din interior, în raport cu lichidul extracelular, în care raportul concentraţiilor este invers. Concepţiile asupra structurii şi funcţiilor membranei au evoluat de la cele iniţial formulate, adică modelele elaborate de Robertson şi apoi de Danielli-Davson, la modelul de „mozaic mobil" sugerat de Sjöestrand Barajas (1970), Singer (1973) (fig. XVIII.6). În concepţia primelor modele, explicaţia permeabilităţii selective a membranelor celulare era corelată cu componentele lor lipidice. În concepţia mai nouă, accentul funcţional este strîns legat de proteinele din membrană — ca de ex. modelul de membrană mitocondrială (vezi fig. XVIII.6). În acest model componentele proteice globulare, foarte numeroase, au printre ele molecule de fosfolipide. De altfel, în structura multor membrane celulare proteinele reprezintă 2/3 iar lipidele numai 1/3 din totalul componentelor. Gradientul concentraţiei ionilor de o parte şi de cealaltă a membranei este explicat prin două feluri de mecanisme: unul pasiv, celălalt activ. Cel pasiv este de tipul unei repartiţii de echilibru Donnan, iar cel activ — pompa de Na^+ şi K^+ — ATP-dependentă, funcţionează împotriva gradientului de concentraţie, transportînd K^+ în interiorul celulei şi Na^+ în spaţiul extracelular (fig. XVIII.7).

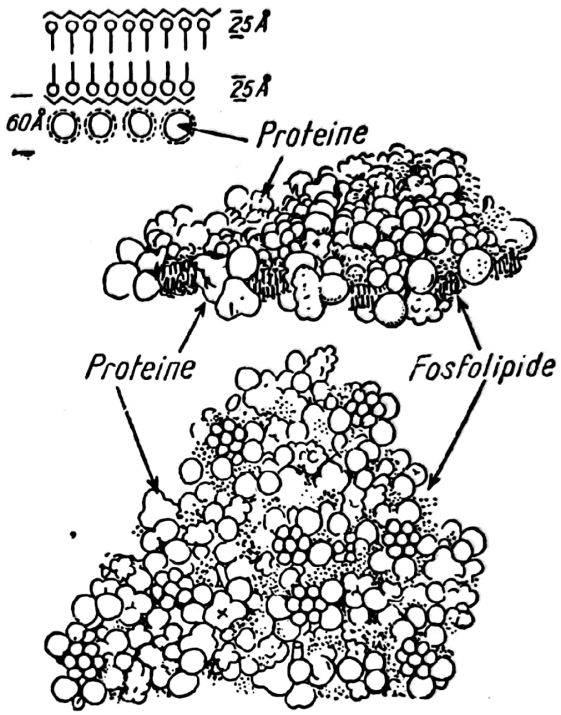


Fig. XVIII.6. Model de membrană mitocondrială de tip „mozaic mobil" (sugerat de Sjöestrand, Barajas, Singer).

Membranele excitabile conţin anumite situsuri specifice sau „pori polari" (canale de trecere), prin care în anumite condiţii pot trece ionii de Na^+ şi K^+. Deoarece în membrana neexcitată sînt mai mulţi pori deschişi pentru K^+ decît pentru Na^+, se produce prin această difuziune selectivă, de la interior către exterior, un potenţial de difuziune la nivelul membranei. Interiorul membranei se *încarcă negativ faţă de exterior, încărcat pozitiv*, deoarece ionii nedifuzabili încărcaţi negativ (anioni proteici, esteri fosforici) rămîn în interior. În stare de repaus deci, membrana excitabilă este încărcată pozitiv (la exterior). Membrana celulară şi fibrele nervoase — ca orice membrană excitabilă — prezintă o distribuţie ionică inegală, în sensul descris, care condiţionată fiind de permeabilitatea mai mare a membranei în stare de repaus pentru potasiu decît pentru sodiu, determină diferenţa de potenţial dintre interior şi exterior.

5.2. POTENŢIALUL ŞI CURENTUL DE ACŢIUNE

Sub acţiunea unui sistem de excitaţie permeabilitatea membranei se schimbă brusc în sensul creşterii sale pentru ionul Na^+ (cca de 500 ori). Este

declanşat un curent de intrare a Na^+ în celule fără aflux concomitent de ioni negativi. În acest moment al excitaţiei se ajunge la o inversare a semnului potenţialului electric, membrana încărcîndu-se negativ (depolarizare).

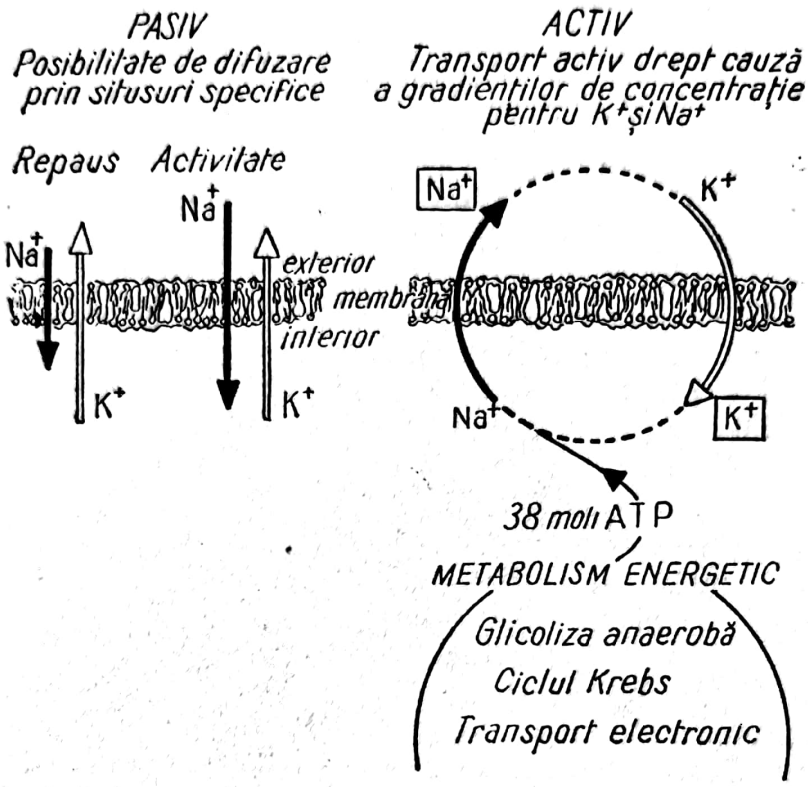


Fig. XVIII.7. **Posibilităţi de transport ionic activ şi pasiv prin membrane excitabile (adaptare după Stampfl).**

Prin acţiunea unui stimul (excitaţie) la suprafaţa fibrei nervoase se produce modificarea descrisă a permeabilităţii membranei pentru cationi şi depolarizarea menţionată, cu inversarea semnului electric. Între zona activă, devenită negativă prin depolarizarea membranei nervului şi regiunea imediat adiacentă, inactivă, încă polarizată (deci încărcată pozitiv) se naşte o diferenţă de potenţial şi un curent electric ce se manifestă mai departe ca o undă de depolarizare ce se propagă din aproape în aproape (fig. XVIII.8).

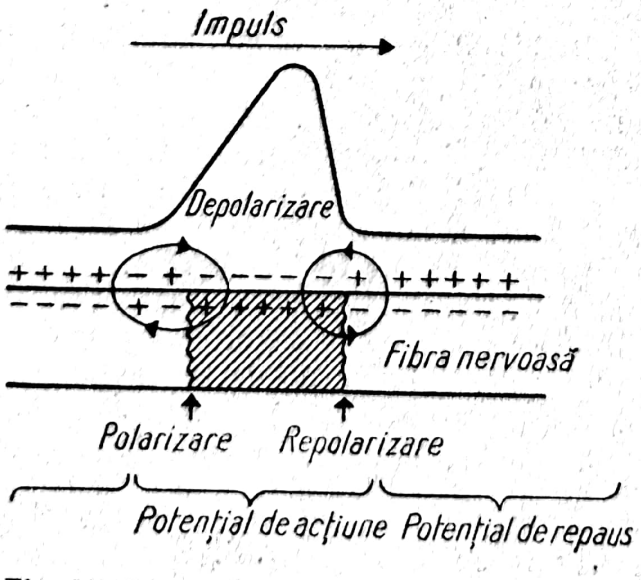


Fig. XVIII.8. **Fenomene electrice în propagarea impulsului nervos (adaptare după Hodgkin).**

5.3. CAUZELE MODIFICĂRII PERMEABILITĂŢII MEMBRANEI

Cauzele ce produc modificarea permeabilităţii selective a membranei neuronale nu sînt încă complet clarificate şi nu este stabilită încă o poziţie unanim recunoscută şi riguros dovedită în privinţa lor. Nach-

Scanned with OKEN Scanner

manson propune o ipoteză prin care atribuie acetilcolinei un rol important în geneza fenomenului de modificare a permeabilității selective. Această concepție postulează că acetilcolina acționează chiar în interiorul membra-

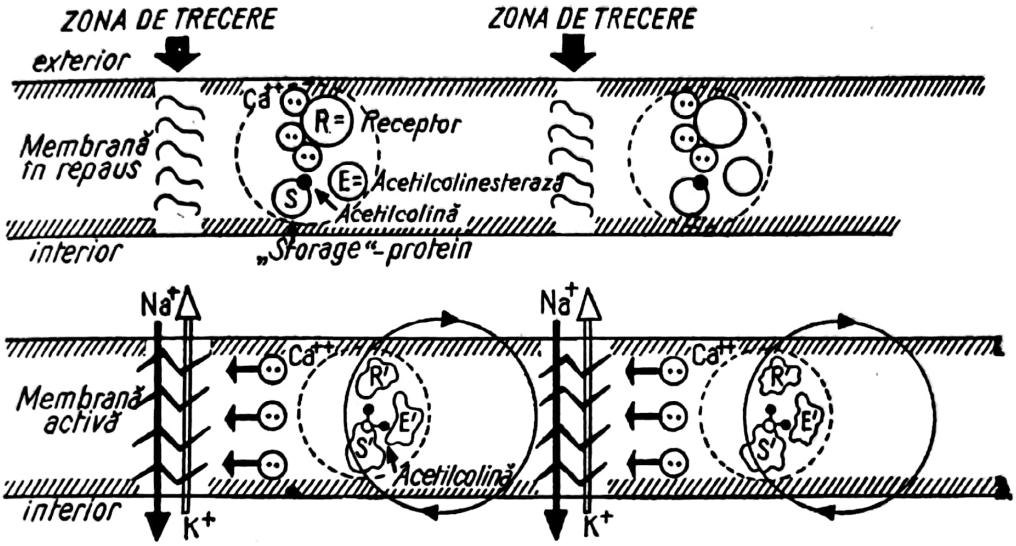


Fig. XVIII.9. Ciclul Nachmanson: reprezentare schematică a reacțiilor generate prin sistemul acetilcolină.

nei excitabile. Căldura produsă și absorbită în timpul activității electrice impune — fără alternativă — concluzia că schimbările permeabilității ionice sînt efectuate prin reacții chimice.

În aceste reacții corelate cu activitatea prin care acetilcolina intervine în deschiderea „porilor polari" (fig. XVIII.9), sînt implicate trei feluri de proteine. Situația pare să se prezinte în modul următor:

a) *în stare de repaus* acetilcolina este legată de proteina „S" (storage) fiind depozitată astfel, în formă legată, inactivă. O a doua proteină (R) funcționează ca receptor al acetilcolinei după liberarea sa din forma precedentă. Cea de a treia proteină este acetilcolinesteraza, hidrolaza specifică ce descompune mediatorul acetilcolină. Acest complex proteic este în legătură directă cu o zonă din membrana excitabilă, unde sînt situați „porii polari", ce pot fi traversați de ioni în timpul activității.

b) *În stare de activitate*, excitația disociază acetilcolina de proteina de rezervă „S" și o transferă receptorului „R". Reacția provoacă o *schimbare conformațională* a proteinei R probabil prin acțiune allosterică. Ionii Ca^{++} (legați de R în stare de repaus) sînt liberați și acționează asupra componentelor din zona de trecere (porii polari) producînd modificări conformaționale ale fosfolipidelor, lipoproteinelor și altor elemente. Aceste modificări permit mișcările ionice. Pentru o moleculă de acetilcolină activată, cca 20 000—30 000 ioni traversează membrana în ambele direcții. Acetilcolina acționează ca un semnal. Datorită cunoștințelor incomplete asupra structurii moleculare a membranelor, nu poate fi elaborată în prezent o teorie cantitativă a evenimentelor moleculare ale bioelectricității. Nachmanson sugerează un model „integral", centrat de ideea unităților funcționale bazale de excitație, ce ar permite interpretarea mai multor elemente de bioelectricitate ale țesutului nervos: perioada de latență, pragul de excitație, inițierea influxului, răspunsul

Scanned with OKEN Scanner

gradat şi răspunsul „tot sau nimic". În structura unităţii bazale, în jurul unei zone de trecere s-ar grupa 6—10 ansambluri ale proteinelor ce intervin în diferite etape ale activităţii acetilcolinei. Distanţa între unităţi s-ar putea evalua la 1 400 Å, pe baza studiilor experimentale făcute asupra membranei din electroplăcile de ţipar electric. Ansamblul ar funcţiona asemenea unui lanţ de transport electronic enzimatic. Elaborarea modelului de membrană excitabilă a lui Nachmanson, cu integrarea datelor de biochimie şi biofizică, reprezintă un efort pentru fundamentarea unei teorii cantitative a excitaţiei la nivel molecular.

6. PATOLOGIA BIOCHIMICĂ A SISTEMULUI NERVOS

6.1. PATOLOGIA BIOCHIMICĂ ÎNNĂSCUTĂ

Această patologie, datorită leziunilor biochimice genetice determinate, este prezentată în capitolele de metabolism. Important este faptul că într-o serie de afecţiuni prin deficit enzimatic, diagnosticul poate fi pus antenatal, în perioada fetală, prin amniocenteză, urmată de cultivarea celulelor din lichidul amniotic, cu investigaţii enzimatice pe preparatele obţinute. Diagnosticul prenatal ar permite în prezent depistarea a cca 70 de afecţiuni metabolice şi în unele cazuri instaurarea unui tratament, înainte de naştere, prin administrarea factorilor deficitari. Trebuie subliniat de asemenea faptul că un sfert din bolile cauzate de erori înnăscute ale metabolismului au simptomatologie neuropshică, fie că tulburarea aparţine metabolismului acizilor aminaţi, lipidelor, glucidelor, porfirinelor, fie substanţelor minerale.

6.2. PATOLOGIA BIOCHIMICĂ DOBÎNDITĂ

6.2.1. DEMIELINIZAREA

Membrana mielinică derivă din elementele satelite, celulele Schwann, în nervul periferic şi echivalentul lor din sistemul nervos central, oligodendroglia. Fenomenul morfologic al demielinizării este strîns legat de sinteza cheratinei şi proteolipidelor. O etapă importantă a demielinizării este formarea tecii de mielină prin organizarea reţelelor structurale de neurocheratină şi proteolipide, cu încorporarea lipidelor specifice (sfingomielină, în special). În demielinizare se produce o scădere a tuturor constituenţilor specifici ai tecii de mielină.

6.2.2. DEGENERESCENŢA WALLERIANĂ

Urmează secţionarea unui nerv şi produce distrugerea tecii de mielină în segmentul distal, fenomenul desfăşurîndu-se în trei etape: a) scăderea concentraţiei lipidelor cu creşterea concentraţiei relative a cerebrozidelor. Odată cu diminuarea conductibilităţii impulsului nervos, consumul de oxigen este scăzut, iar acetilcolinesteraza, colinacetilaza şi fosfo-monoesteraza sînt pe cale de dispariţie. În acelaşi sens variază concentraţia coenzimelor tiamin-pirofosfat şi NAD-dependente, precum şi încorporarea acetatului marcat cu ^{14}C. b) În faza a II-a se produce o intensă activitate lipolitică — cu dispa-

Scanned with OKEN Scanner

riţia în acelaşi ritm a colesterolului şi a sfingomielinei. Se constată prezenţa colesterolului neesterificat iar inozitolul, etanolamina, plasmalogenele şi fosfatidilserina apar ca produşi ai dezintegrării mielinei. Se observă creşterea unor activităţi enzimatice (fosfomonoesterazele acide 5'-nucleotidaza β-glucuronidaza, a consumului de oxigen, precum şi a unor precursori lipidici. c) În faza finală acizii nucleici şi enzimele dispar complet, materialul rezidual fiind alcătuit din proteoglicani (colagen).

În segmentul proximal creşte concentraţia de ADN, ARN, şi activitatea fosfomonoesterazelor alcaline şi acide.

În corpul celular doza de scădere iniţială a conţinutului în ARN — concomitent cu scăderea activităţii sistemului succinoxidazic — se produce o creştere a concentraţiei acestui acid nucleic precum şi a proteinelor şi lipidelor.

6.2.3. POLINEVRITELE

Patologia biochimică a nervului cuprinde modificările moleculare ce se produc în cadrul polinevritelor de diferite cauze: carenţiale (vitamina B_6, acid nicotinic, în pelagră şi alcoolism cu perturbarea sistemelor enzimatice NAD şi NADP-dependente); disproteinemice (boala Waldenström); dislipidemice, prin tulburarea metabolismului porfirinic, prin acţiuni toxice datorită metalelor grele (blocarea grupărilor tioloce).

6.2.4. BIOCHIMIA STĂRILOR AMNEZICE

Datele existente în acest domeniu sînt foarte puţine şi deduse din mecanismul biochimic al memoriei şi învăţării, în care se cunoaşte ca substrat molecular al procesului amnezic, un ARN mesager. Cercetările lui Hyden au dus la concluzia că electrogeneza şi sinteza de ARN sînt proprietăţile cele mai caracteristice neuronului. În procesul de învăţare şi de condiţionare, concentraţia m-ARN-ului nuclear creşte. Diminuarea memoriei (pînă la amnezie) ar putea fi determinată de scăderea conţinutului de ARN ca şi de creşterea frecvenţei erorilor de transmisie şi translaţie a informaţiei de pe molecula de ADN neuronal. După Laborit (1969) şi Walley (1965), una din aminele biogene, 5-HT ar juca un rol important în procesele de memorizare şi de pierdere a acestei facultăţi. Majoritatea structurilor cerebrale implicate în fenomenul memoriei (hipocampul, nucleii striaţi, paleocortexul) conţin cantităţi apreciabile de 5-HT.

6.2.5. BIOCHIMIA STĂRILOR COMATOASE

De cauze endo- sau exogenă, starea comatoasă este caracterizată prin pierderea conştienţei, a motilităţii şi sensibilităţii, asociată cu tulburări ale mecanismelor de reglare a vieţii vegetative. Comele provocate prin perturbări ale metabolismului cerebral pot fi grupate în trei categorii, în funcţie de patogenie: a) prin aport insuficient de glucoză sau hipoglicemie, de cauze diverse; b) prin aport insuficient de oxigen, adică prin hipoxie hipoxemică sau prin hipoxie hemodinamică; c) prin tulburări ale activităţii metabolice cerebrale, prin intoxicaţii endogene sau exogene.

Scanned with OKEN Scanner

— *Come prin intoxicaţii endogene. Comele hepatice.* În cursul hepatopatiilor acute instalarea stării comatoase are la bază sindromul hepatopriv. Se produc prin tulburări enzimatice complexe, interesînd în mod special metabolismul oxidativ hepatic. În hepatopatiile cronice coma este rezultatul pătrunderii în circulaţia generală a unor substanţe toxice de origine intestinală, ce nu sînt detoxifiate în ficat: amoniac, metionină, anumite amine (cadaverină, putrescină). Hiperamonemia este factorul esenţial în determinismul tulburărilor neurologice din encefalopatia hepatică. O corelaţie fidelă există între intensitatea comei hepatice şi concentraţia NH_3 din l.c.r. Se reaminteşte că mecanismele de detoxifiere a amoniacului sînt: ciclul ureogenetic Krebs-Henseleit (în ficat) şi sistemul acid glutamic-glutamină, ce se desfăşoară preponderent în celulele nervoase şi musculare.

Coma diabetică, acido-cetozică, este o complicaţie a diabetului decompensat, caracterizată prin acumularea de corpi cetonici a căror producere creşte, ca urmare a intensificării gluconeogenezei (din lipide mai ales). Acidoza metabolică determinată prin acumularea de corpi cetonici se asociază cu scăderea mare a rezervei alcaline şi a pH-ului plasmatic, precum şi cu tulburări hidroelectrolitice ce determină simptomele neurologice. O altă interpretare a acestora este legată de exagerarea derivării metabolismului oxidativ pe calea şuntului GABA.

Coma uremică. În această stare celula nervoasă nu poate utiliza glucoza, oxigenul, al căror aport este de altfel normal. Alterarea barierii hematoencefalice facilitează pătrunderea unor substanţe toxice în sistemul nervos central, fenomenele neuropshice fiind determinate de gradul de impregnare al centrilor nervoşi cu aceste substanţe. Concentraţia ridicată de uree — substanţă netoxică — pare să joace un rol în mărirea permeabilităţii celulare pentru pătrunderea substanţelor toxice, printre care s-ar putea socoti următoarele: substanţe aromatice-scatol, indol-polipeptidele, guanidina, etanolaminele, dimetilalamina. Hipercatecolaminemia ar cauza anxietatea şi starea de agitaţie, iar excesul de acetonă şi butilenglicol ar exercita acţiunea narcotică.

Coma hipercapnică, produsă prin insuficienţă respiratorie în cursul afecţiunilor bronhopulmonare, la care se supraadaugă o infecţie. Hipercapnia şi hipoxia cerebrală provoacă vasodilataţie, edem cerebral, stază papilară. Biochimic este caracterizată — pe lîngă creşterea de CO_2 — prin stare de acidoză, cu scădere de pH şi a rezervei alcaline. Intrarea şi ieşirea din starea de comă se poate produce alternativ. Oxigenoterapia trebuie aplicată cu prudenţă, deoarece înlăturarea hipoxiei poate determina reducerea mişcărilor respiratorii şi intensificarea acidozei.

— *Come prin intoxicaţii exogene. Coma barbiturică* are la bază atît efectul toxic direct asupra celulelor corticale şi a celor din sistemul activator ascendent, deprimarea centrului respirator cu hipercapnia consecutivă, cît şi scăderea debitului sanguin şi a consumului de oxigen cerebral. Sindromul biochimic este caracterizat prin inhibarea reversibilă a oxidării glucozei şi piruvatului, decuplarea fosforilării oxidative prin inhibarea fosforilării şi nu prin reducerea consumului de oxigen.

Coma etilică este caracterizată din punct de vedere biochimic — ca şi coma barbiturică — printr-o inhibiţie a fosforilării, fără scăderea remarcabilă a consumului de oxigen. Se poate asocia uneori o stare de hipoglicemie.

Scanned with OKEN Scanner

Coma oxicarbonată, are la bază hipoxia determinată de blocarea hemoglobinei prin CO, a cărui afinitate este de 204 ori mai mare decît a oxigenului pentru acest pigment. Consecința imediată este hipoxia de transport și hipoxia tisulară, accentuată prin prezența carboxihemoglobinei, care deplasează spre stînga curba de disociere a oxihemoglobinei încă neblocată. Sînt inhibate de asemenea enzimele respiratorii heminice, implicate în lanțul respirator de transport electronic.

Coma sau encefalita saturnină pare să fie mai puțin rezultatul atingerii directe a centrilor nervoși, cît mai ales consecința modificărilor vasculare, corelate cu acțiunea inhibitoare asupra unor sisteme enzimatice. Plumbul poate bloca grupările SH a importantelor SH-enzime, sau poate deplasa ionii metalici biologic activi din metalenzime. Se mai ia în considerație și fixarea plumbului pe structurile membranoase ale celulei, cu împiedicarea sintezei proteinelor enzimatice. În ansamblu, în encefalopatia saturnină procesele de oxidoreducere celulară sînt alterate cu hipoxie și hipercapnie consecutivă și cu scăderea consumului de oxigen cerebral.

Coma prin intoxicație cu compuși organo-fosforici. Compușii organo-fosforici (unele pesticide) pot provoca intoxicații profesionale, ca urmare a unei manipulări neprotejate. Această comă are la bază inhibiția colinesterazelor, cu hipoactivitate vagomimetică, consecutivă acumulării de acetilcolină. Aceasta determină trei grupuri de efecte toxice: efecte muscarinice, datorate acumulării acetilcolinei nehidrolizate în terminațiile nervoase postganglionare (hipersecreții, bronhospasme, hipotensiune, vărsături, colici abdominale); efecte nicotinice, datorate acumulării acetilcolinei în plăcile neuromusculare (fibrilații, crampe, pareze musculare); efecte asupra sistemului nervos central, inițial de stimulare cu stare de agitație, urmată de depresiune, adinamie, comă.

Come prin intoxicații exogene medicamentoase. Dintre acțiunile ce stau la baza instalării stărilor comatoase în aceste situații pot fi subliniate: „acțiunea narcobiotică" exercitată de unele neuroleptice de tipul clorpromazinei, decuplarea fosforilării oxidative din mitocondriile cerebrale, inhibiția citocromului și a citocromo-reductazei provocată de tranchilizante de tipul meprobamat sau clordiazepoxid (Librium) sau diazepam (Valium). Substanțele antidepresive de tipul imipraminei sau al derivaților hidrazinei (Niamid) pot provoca stări comatoase prin inhibiția MAO (monoaminoxidazei) ce intervine în metabolismul catecolaminelor, cu rol în menținerea stării de veghe.

7. LICHIDUL CEFALO-RAHIDIAN

Lichidul cefalo-rahidian se găsește în ventriculii cerebrali și spațiul subarahnoidian. Prin difuziune, el este în schimb relativ rapid, cu lichidu, interstițial al creierului, cu care are de altfel asemănare de compoziție. Schimbul metabolic între l.c.r. și celula nervoasă este permanent. Împreună cu așa-numita „barieră hemato-encefalică", funcția l.c.r. este de a apăra celula nervoasă, menținînd constant mediul intern al creierului. Creierul este astfel apărat de tulburările acido-bazice (nerespiratorii) din restul organismului

Scanned with OKEN Scanner

cît şi de tulburările metabolismului electrolitic ce privesc ionii K^+, Na^+, Cl^-. În privinţa mecanismului formării l.c.r. sînt două teorii şi anume:

— *ultrafiltrarea* l.c.r. fiind considerat un ultrafiltrat sau dializat al plasmei sanguine;

— *secreţia* l.c.r. fiind secretat de celulele plexului coroid ventricular, cu un debit de 0,3—0,4 ml/minut, volumul său total fiind de 150 ml (reînnoit la interval de 3—4 ore).

Principalele proprietăţi fizico-chimice ale l.c.r. Este un lichid limpede, transparent, incolor, cu aparenţă de apă. Densitatea sa este cuprinsă între 1 002—1 008, punctul său crioscopic este egal cu acela al plasmei sanguine. Delta ($\Delta = -0,56$), pH-ul între 7,3—7,4, rezerva alcalină 40—60 volume CO_2 la 100 ml (18—27 mEq). Compoziţia l.c.r. este redată în tabelul XVIII.4 cu micile diferenţe ce există între lichidul ventricular şi cel lombar. Pot fi sub-

Tabelul XVIII.4

Compoziţia lichidului cefalo-rahidian (la 1 000 ml)

Componente	Concentraţie
Componente minerale:	
Clor	4,50 g (127 mEq)
Sodiu	3,27 g (142 mEq)
Potasiu	0,12 g (3 mEq)
Calciu	0,05 g (2,5 mEq)
Magneziu	0,03 g (2,5 mEq)
Fosfor neorganic	0,02 g (1 mEq)
Componente organice	
Glucoză	
lichid ventricular	0,80 g
lichid lombar	0,55 g
Acid lactic	0,09—0,15
Proteine	
lichid ventricular	0,10—0,16 g
lichid lombar	0,16—0,28 g
Albumină	
lichid ventricular	0,08—0,14 g
lichid lombar	0,14—0,25 g
Globuline	
lichid venticular	0,01—0,04 g
lichid lombar	0,02—0,08 g
Azot neproteic	0,16—0,21 g
Acid uric	0,02 g
Colesterol	urme
Lecitină	0,22 g
Creatinină	0,01 g
Vitamină	0,01 mg

(după Polonovski M.)

liniate unele aspecte diferenţiale faţă de plasmă. Astfel, concentraţia clorului este mai mare decît în plasmă (127 mEq faţă de 102 mEq). Clororahia creşte în crize convulsive şi prezintă scăderi în meningitele t.b.c. În acest caz prezenţa triptofanului întăreşte diagnosticul. Concentraţia ionului Mg^{++}

Scanned with OKEN Scanner

este de asemenea de două ori mai crescută decît în plasmă. Nivelul calciului este comparabil cu acela al concentraţiei Ca seric ultrafiltrabil (cca 50% din cea plasmatică). Concentraţia fosforului anorganic este de asemenea mai scăzută, în timp ce aceea a bicarbonaţilor şi a ionului H^+ este aceeaşi cu cea plasmatică.

— Cuprirahia normală este de 6—10 μg/100 ml, putînd atinge 20—30 μg în degenerescenţa hepato-lenticulară (boala Wilson), concentraţia ureică a l.c.r. reflectă pe cea plasmatică (în medie 0,25 g/1 000 ml).

— Glicorahia este în medie 0,60 g/l pentru o glicemie de 1 g/l. Raportul constant dintre glicorahie şi glicemie se alterează cînd intervine un proces enzimatic glicolitic, ce se petrece local, datorat fiind polimorfonuclearelor sau agenţilor microbieni. Scăderea glicorahiei, este un semn constant al meningitelor purulente şi mai ales al celor meningococice. Hiperglicorahia se întîlneşte în encefalita epidemică, sifilisul meningeal, hipertensiunea craniană şi diabetul zaharat (pancreatic).

Proteinorahia în medie de 0,20 g/l creşte paralel cu mărirea numărului de elemente celulare în cursul meningitelor acute sau subacute TBC şi sifilitice. Disocierea albumino-citologică (adică numai creşterea proteinorahiei) se produce în compresiuni medulare şi cerebrale, în pahimeningite. Din punct de vedere calitativ fracţiunile proteice conţinute în l.c.r. corespund celor existente în plasmă. Sînt observate diferenţe de repartiţie. Caracteristicile esenţiale proteinogramei l.c.r. sînt următoarele:

— procent ridicat de prealbumină (bogat în triptofan):

— α-1-antitripsina este un component major al α-globulinei în l.c.r.;

— în zona de mobilitate β1-transferină, se notează un arc dublu ce semnalează prezenţa unei transferine, poate de origine cerebrală.

— existenţa post-gamaglobulinelor cu greutate moleculară mică ce conţin un procent însemnat de prolină, hidroxiprolină, şi hidroxilizină, în cantitate mică.

— în l.c.r. normal nu se găseşte fibrinogen.

În compresiunile medulare, l.c.r. xantocromic (prin derivaţii catabolismului Hgb-ei) conţine fibrinogen (sindrom Froin).

În mielomul multiplu se poate decela în l.c.r. anomalia globulinică din ser.

Creşterea gamaglobulinelor în l.c.r. se observă în meningitele TBC, scleroză în plăci, sifilis nervos.

Scanned with OKEN Scanner

Capitolul XIX

RINICHIUL ŞI URINA

Rinichiul este un organ cu important rol homeostatic. El menţine constantă compoziţia şi volumul lichidului extracelular. Funcţia sa principală este producerea urinei, prin care se reglează tranzitul hidric, se elimină produsele finale ale metabolismului, substanţele în exces şi cele străine — ca atare — sau produsele lor de detoxifiere.

Funcţiile homeostatice ale rinichiului pot fi încadrate în următoarele patru categorii:

a) *reglarea volumului şi osmolarităţii* fluidelor organice prin procese selective de resorbţie sau secreţie a ionilor şi a apei;

b) *reglarea echilibrului acido-bazic* în cooperare cu plămînul şi cu diferitele sisteme tampon din spaţiul extracelular. Controlul pH-ului joacă un rol însemnat, alături de păstrarea constanţei şi distribuţiei fiecărui ion în parte;

c) *eliminarea produselor finale ale metabolismului* — solubile şi nevolatile (uree, acid uric, creatină, creatinină, bilirubină conjugată, electroliţi etc.), precum şi a substanţelor străine, metabolizate prin enzimele „xenobiotice".

d) *participarea la unele procese metabolice de biosinteză şi reglare*: biosinteza, reglarea şi secreţia unor hormoni ca renina, eritropoietina, 1, 25-dihidroxicolecalciferol (reglarea nivelului Ca^{2+} în lichidul extracelular).

1. ELEMENTE DE STRUCTURĂ FUNCŢIONALĂ RENALĂ

Unitatea morfo-funcţională renală este nefronul. La om fiecare rinichi conţine cca 1 milion de nefroni. Deoarece lungimea unui nefron este, în medie, de 50 mm, întinderea totală a nefronilor într-un rinichi este de cca 50 km. Formarea urinei se bazează, în principal, pe combinaţia dintre unele procese fundamentale care se petrec la nivelul diferitelor segmente ce alcătuiesc nefronul. Aceste procese sînt: filtrare, la nivelul glomerulului; *retroresorbţie specifică* în tubuli şi excreţie tubulară, prin care substanţele extrase trec din lichidul extracelular, prin transfer, în urină; *secreţia* substanţelor formate în rinichi.

1.1. GLOMERULUL

Are forma şi mărimea unei sfere cu diametrul de 200 μ, ce posedă un pol vascular — în care pătrunde arteriola aferentă şi de unde iese arteriola eferentă — şi un pol urinar care se racordează cu prima porţiune a tubului urinifer, tubul contort proximal. Glomerulul cuprinde un înveliş, capsula

Scanned with OKEN Scanner

Bowmann şi un ghem de capilare (flocculus). Spaţiul urinar cuprins între acest ghem şi capsulă se deschide în tubul contort proximal. La polul vascular se găseşte şi aparatul juxtaglomerular, situat între arterele aferente şi eferente. El este alcătuit din mai multe elemente (celule granulate, macula densa

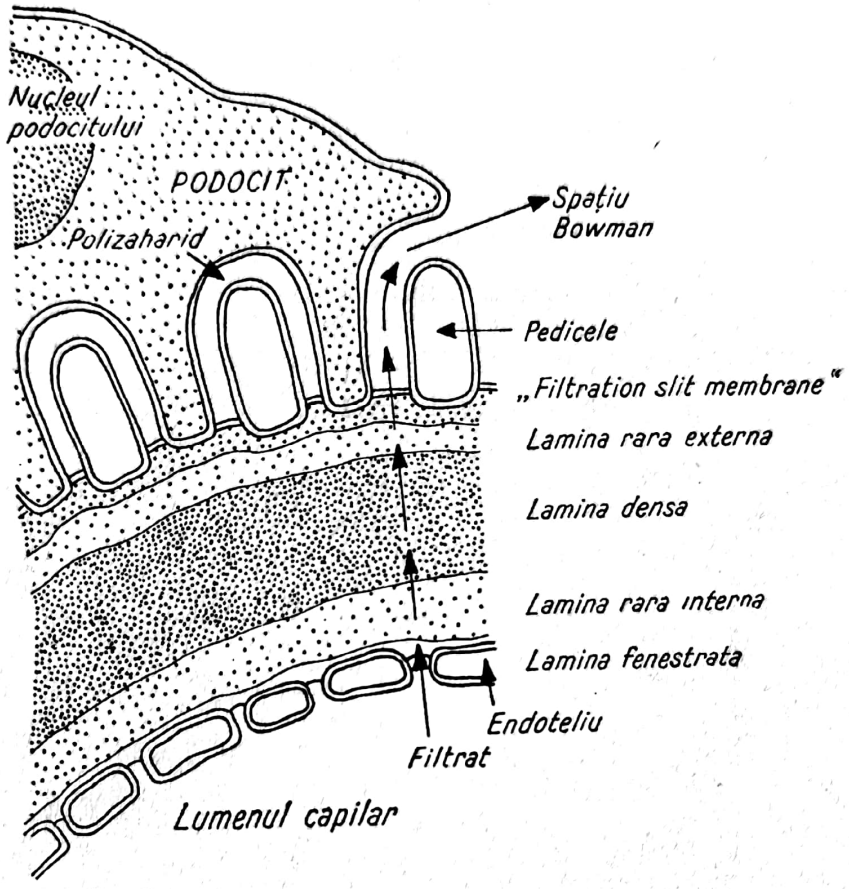


Fig. XIX.1. Secţiune schematică prin peretele capilarului glomerular.

şi lacis-ul din media arteriolei aferente). Trebuie menţionat în mod special că celulele granulate au un caracter de celule musculare netede, modificate, ce secretă renina. Capsula Bowmann este constituită dintr-o membrană bazlă, dublată pe faţa sa profundă cu un epiteliu plat. Ea este în continuitate cu membrana bazală tubulară şi cu aceea a capilarelor glomerulare. Membrana bazală cuprinde trei straturi: unul central electronic dens — şi două, mai puţin dense electronic, lamina rara, externa şi interna (fig. XIX.1). Endoteliul capilar este situat înăuntrul membranei bazale, înconjurînd în întregime lumenul capilar. El este „fenestrat" avînd pori cu diametrul de 600—1 000 Å. Faţa externă a membranei bazale este acoperită de celule epiteliale denumite „podocite", ele fiind inserate prin „pedicele" (picioruşe). Între aceste picioruşe este zona de filtrare prin membrană („filtration split membrana"). Sîngele care trece din glomerulul capilar în spaţiul tubular trebuie să traverseze, deci, o membrană ce constă din trei structuri: endoteliul capilar (fenestrat), membrana bazală (cu cele trei straturi) şi un strat epitelial complex (cu podocite). Complexitatea şi dimensiunile structurilor de trecere condiţionează permeabilitatea selectivă a suprafeţei de filtrare în funcţie de diametrul, forma, greuta-

tea moleculară şi sarcina electrică a substanţei ce urmează să traverseze membrana. Factorul limitant principal al excreţiei urinare a macromoleculelor este greutatea lor moleculară care nu poate depăşi, în medie, 70 000 daltoni.

1.2. TUBUL URINIFER

Plecînd dinspre capsula Bowmann tubul urinifer cuprinde în ordine succesivă: tubul contort proximal, ramura descendentă, subţire a ansei lui Henle, care se curbează şi se continuă printr-o ramură ascendentă mai largă, urmată de tubul contort distal. Mai mulţi tubi renali se varsă într-un tub colector sau canalul Bellini.

1.2.1. TUBUL CONTORT PROXIMAL

Posedă un epiteliu de tip permeabil, ale cărui celule au o „margine în perie", alcătuită din microvili. Prin această dispoziţie suprafaţa luminală este mărită de cca 60 de ori. Celulele alcătuiesc o reţea complexă deasupra membra-

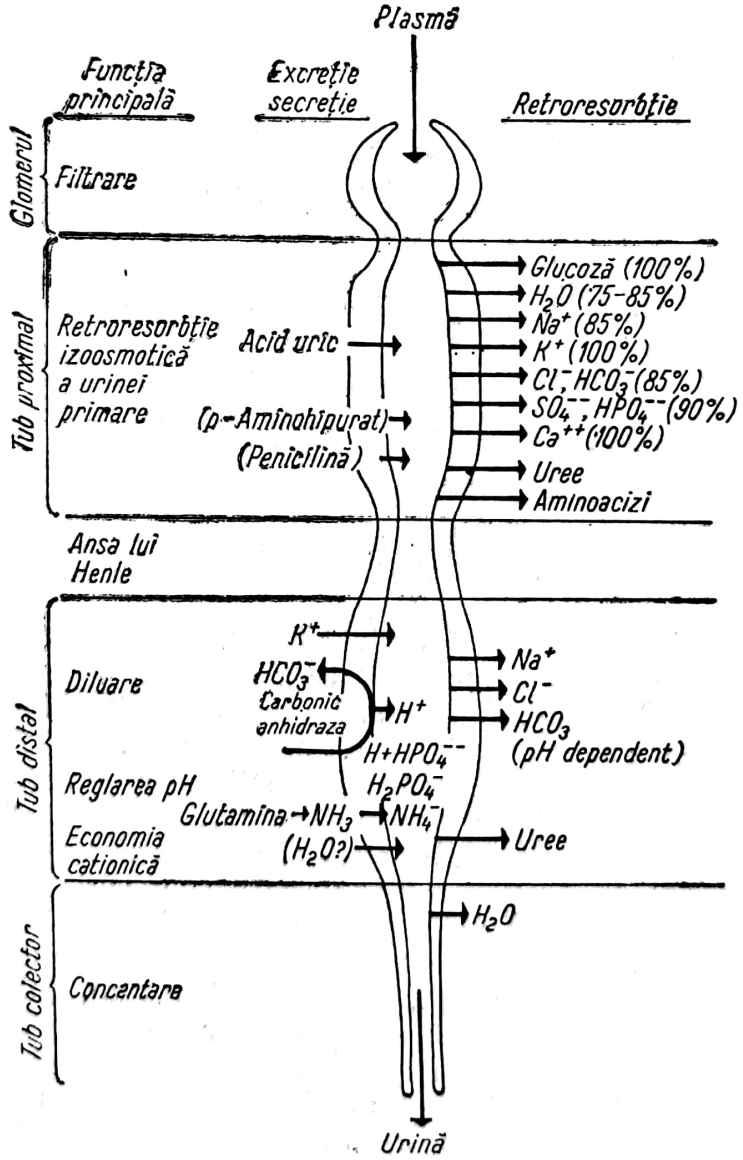


Fig. XIX.2. Schemă sintetică a funcţiilor renale. (adaptare după Rapoport).

Scanned with OKEN Scanner

nei bazale. În vecinătatea membranei aceste celule posedă numeroase mitocondrii. În ansamblul structural sînt semnalate „canale de trecere" paracelulare. Substanţele ce sînt transportate prin procese active ATP-dependente iau calea transcelulară de reabsorbţie, în timp ce alte substanţe (ca ionii Cl^- de exemplu), pot fi parţial reabsorbiţi, pe cale paracelulară. În acest segment sînt reabsorbite 60—70% din totalul apei şi ionilor, totalul de glucoză, aminoacizii, ureea, bicarbonaţii, fosfatul, sulfatul şi ionii de Ca (fig. XIX. 2).

1.2.2. ANSA HENLE

Are în ramura sa descendentă celule epiteliale sărace în mitocondrii şi microvili puţini (zona fiind de transport pasiv pentru apă şi electroliţi), iar în cea ascendentă aparatul mitocondrial este bine reprezentat, corespunzător necesităţilor de transport activ al ionilor.

1.2.3. TUBUL CONTORT DISTAL ŞI TUBUL COLECTOR

În prima porţiune a segmentului distal celulele sînt asemănătoare cu cele din ramura ascendentă a ansei, iar pe măsură ce se apropie de tubul colector, epiteliul devine asemănător acestui ultim segment, fiind alcătuit din celule cubice cu foarte puţini microvili.

2. METABOLISMUL ŢESUTULUI RENAL

Rinichiul este sediul unui metabolism intens, funcţia sa principală de formare a urinei fiind legată de un mare consum de energie. El este organul care — pe lîngă retină — consumă cea mai mare cantitate de oxigen pe unitatea de greutate. În 24 de ore trec prin rinichi 1 500 ml de sînge (un litru/minut), cantitate ce reprezintă 1/5 din debitul cardiac pe minut. Volumul urinei produsă în acelaşi interval de timp este de 100 de ori mai mic — cca 1 500 l — fapt care exprimă un imens travaliu de reabsorbţie a apei.

2.1. METABOLISMUL ENERGETIC

În zonele cu celule renale, bogate în mitocondrii, reacţiile ciclului tricarboxilic şi enzimele implicate în această sferă metabolică sînt foarte active, fosforilarea oxidativă atingînd nivelul ridicat corespunzător arderilor. Zimograma LHH, efectuează în zona corticală este de tipul anodal, cu preponderenţa izoenzimelor electroforetic rapide, LDH_1, LDH_2, aşa cum se obţine în general, din ţesuturi cu procese energetice respiratorii intense. Ca localizare, sistemul succinoxidazic şi în general cel cicloforazic este abundent în celulele segmentului în care se petrec fenomenele de transfer şi transport activ (tubul contort proximal, ramura ascendentă a ansei Henle). La nivelul medularei renale, procesele energetice sînt preponderent de tip glicolitic anaerob, profilul energetic al acestei zone fiind exprimat în zimograma de tip catodal, în care predomină izoenzimele electroforetic lente: LDH_4, LDH_5.

Ciclul pentozic este slab reprezentat.

Scanned with OKEN Scanner

Derivaţii fosforilaţi. Hexozofosfaţii, triozo-fosfaţii, acidul adenilic, sînt descompuşi sub acţiunea fosfatazelor renale, foarte active, cu producere de H_3PO_4 utilizat în eliminările urinare.

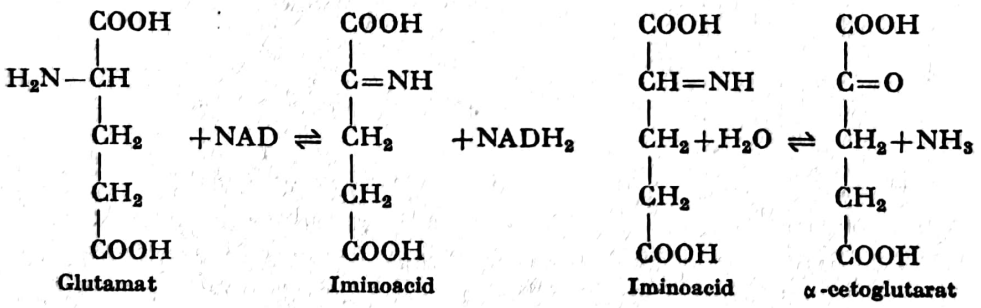
Din metabolismul lipidic, poate fi subliniat ca aspect particular — prin intensitatea procesului — defosforilarea lecitinelor, sub influenţa glicerofosfatazelor.

În ţesutul renal se petrece şi o intensă activitate cetodieretică cu ardere completă a β-hidroxibutiratului şi acetilacetatului.

2.2. METABOLISMUL AZOTAT

Din metabolismul protidic este de reţinut faptul că rinichiul posedă intense sisteme enzimatice de dezaminare a aminoacizilor, dintre care chiar unul pentru dezaminarea celor din seria D, ce nu aparţine seriei naturale şi a cărei semnificaţie biologică nu se cunoaşte.

Din sistemul de enzime ce dezaminează seria naturală un rol deosebit de important în metabolismul renal îl are glutamatdehidrogenaza care prin dezaminare oxidativă transformă (reversibil) glutamatul în α-cetoglutarat, trecînd prin stadiul de iminoacid. Prin corelarea acţiunii acestei enzime cu aceea de transaminare se produce o mare cantitate de amoniac cu liberare de ioni NH_4^+, ce se găsesc în vena renală şi sînt în parte excretaţi prin urină:



Glutamat — Iminoacid — Iminoacid — α-cetoglutarat

Prin reacţia catalizată de această dehidrogenază se stabileşte o importantă interrelaţie între metabolismul protidic şi ciclul acizilor tricarboxilici, ce poate fi alimentat şi pe această cale cu α-cetoglutarat. Datorită reversibilităţii reacţiei catalizată de glutamatdehidrogenază în asociaţie cu transaminazele, este posibilă fixarea amoniacului, cu refacerea aminoacizilor din acizii cetonici corespunzători. Dar sursa principală a amoniacului şi a ionilor NH_4^+, formaţi în rinichi, este reprezentată de glutamină. Grupul amino din glutamină este liberat prin acţiunea complexului enzimatic, glutaminaza II (ω-amidaza), ansamblul reacţiilor fiind redat în fig. XIX.3.

Din metabolismul azotat pot fi menţionate încă două procese. Primul este formarea anhidridei acidului metilguanidinacetic adică al creatininei, din creatină care se petrece de altfel mult mai intens în ficat. Celălalt este un proces de detoxifiere — formarea acidului hipuric, prin conjugarea acidului benzoic cu glicocolul, aminoacid a cărui sinteză se realizează tot în ficat.

Din activitatea de biosinteză proteică a rinichiului — legată de funcţia sa reglatorie endocrină sînt de o deosebită importanţă două proteine ce intervin ca factor de reglare, în hematopoieză, *eritropoietina* iar celălalt în reglarea tensiunii arteriale, *renina*.

Scanned with OKEN Scanner

Eritropoietina este o α-1-glicoproteină, cu greutate moleculară mică, ce conține 10% hexozamine și care pare asociată cu un polipeptid activ. Ea îndeplinește o funcție hormonală, intervenind la diferențierea celulelor de origine în proeritroblaști și la formarea reticulocitelor. *În vitro* favorizează și sinteza

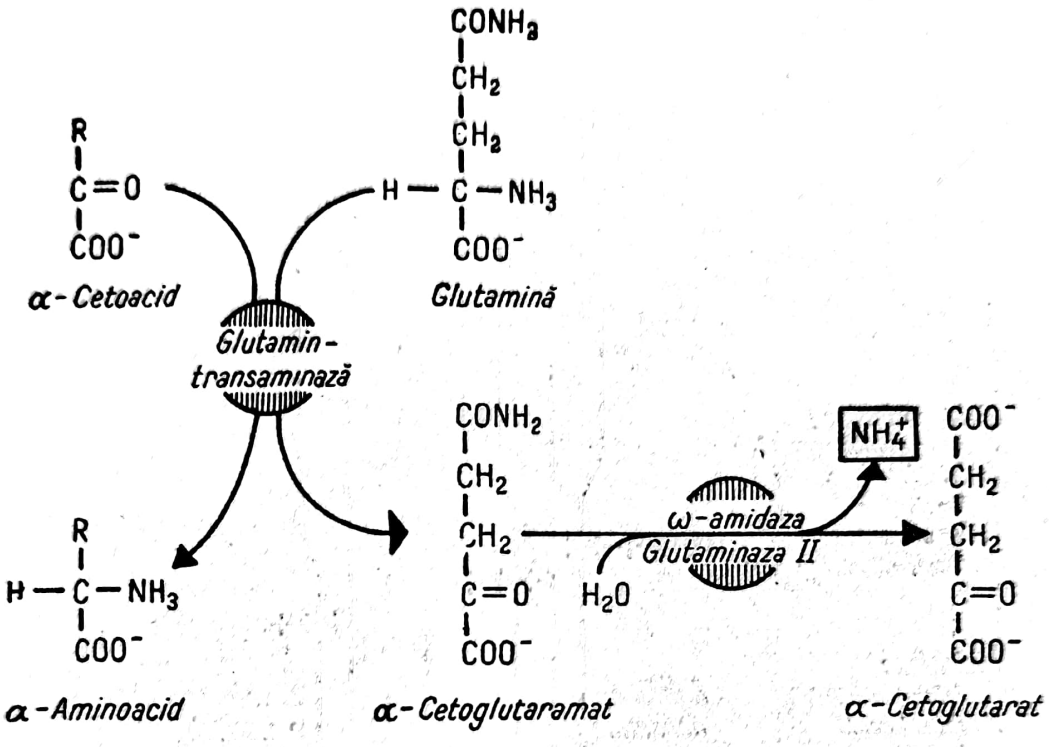


Fig. XIX.3. Liberarea de ioni NH_4^+ prin degradarea glutaminei sub acțiunea complexului enzimatic glutaminază II.

hemului. A fost găsită în sîngele și urina pacienților cu stări de anemie sau poliglobulie. În stări de hipoxie ea stimulează eritropoieza. Experimental s-a arătat că eritropoietina apare la 2—3 ore după instalarea hipoxiei, concentrația sa fiind maximă după 16 ore. Timpul său de înjumătățire este de 3—5 ore.

3. PROFILUL ENZIMATIC RENAL

Încercările de profilare enzimatică pe ansamblul organului și pe diferitele segmente funcționale ale nefronului sînt bazate atît pe tehnici histoenzimologice, topochimice, calitative, cît și pe tehnici cantitative de ultramicrochimie, precedate de microdisecție și aplicate în investigația renală de Mattenheimer. În fig. XIX.4 este prezentat schematic profilul enzimatic normal al nefronului uman, cu referire la conținutul său în oxidoreductaze și hidrolaze. Se relevă bogăția și intensitatea activităților enzimatice — cu excepția 5′-nucleotidazei, a tubilor contorți, în special, a celui proximal (unde se petrec procesele puternic consumatoare de energie) și aspectul invers la nivelul glomerulului unde se petrec procesele pasive ale ultrafiltrării, cu formarea urinei primitive.

În celulele tubulare renale se găsește o enzimă „de membrană" γ-glutamiltranspeptidaza (γGT) — extrem de activă, care pare să fie implicată în

transportul aminoacizilor. Deşi în ţesutul renal activitatea γGT este mai ridicată decît în celelalte ţesuturi, explorarea acestei activităţi enzimatice nu a intrat încă în chimia clinică renală. Pentru stabilirea profilului patologic renal,

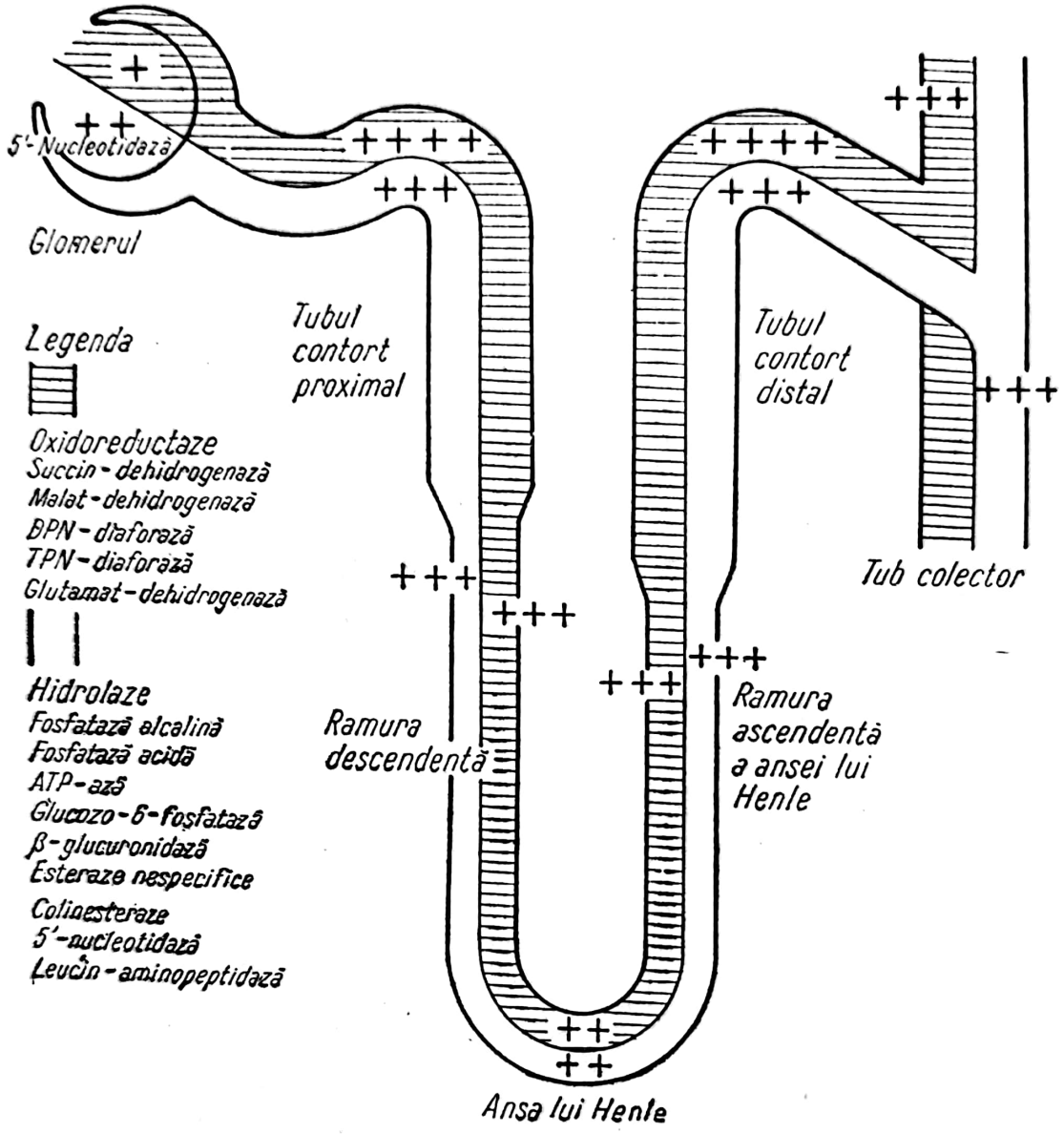


Fig. XIX.4. Profilul enzimatic normal al nefronului uman.

stau la dispoziţie numeroase date experimentale — ce nu pot fi în întregime extrapolate la om şi relativ puţine date concludente asupra modificărilor produse prin patologia umană.

4. FUNCŢIILE RENALE ŞI MECANISMUL FORMĂRII URINEI

După cum s-a spus anterior, principala funcţie a rinichiului, formarea urinei, se realizează în trei etape: filtrare glomerulară, resorbţie tubulară şi secreţie tubulară. Pentru unele substanţe procesele pot fi asociate, aşa cum se vede în schemă (fig. XIX. 5).

Scanned with OKEN Scanner

4.1. FILTRAREA GLOMERULARĂ

Prima etapă a formării ultrafiltratului glomerular din plasma sanguină, ce constituie urina primară, se realizează la nivelul glomerulului. Viteza de formare a ultrafiltratului este de 125 ml/minut, reprezentînd 15—20% din fluxul plasmatic renal corespunzător. Valorile sînt valabile pentru un adult de talie mijlocie cu o suprafață corporală de 1,7 m^2. În interiorul capsulei Bowmann ionii sînt distribuiți conform raportului cerut de echilibrul Donnan:

O substanță care este doar filtrată (ca de ex. inulina) se elimină în urină într-o cantitate egală cu cea filtrată. Aceasta reprezintă produsul dintre concentrația plasmatică și rata de filtrare (F), deci: U=P.F. Din acest raport decurge posibilitatea de a determina rata de filtrare, prin calcul, adică $F = \frac{U}{P}$, în care U este cantitatea eliminată prin urină, în unitatea de timp, iar P nivelul de concentrație plasmatică. Filtratul glomerular conține toate substanțele difuzibile ce se găsesc în plasmă, avînd coeficientul de filtrare egal cu 1. În tabelul XIX. 1 este redată permeabilitatea membranei glomerulare, pentru substanțe cu diferite greutăți moleculare, exprimată prin raportul concentrațiilor din plasmă și filtrat. Datorită acestei condiții globulinele nu apar în ultrafiltratul plasmatic normal, iar albuminele sînt prezente în concentrație foarte mică cca 8 mg/100 ml.

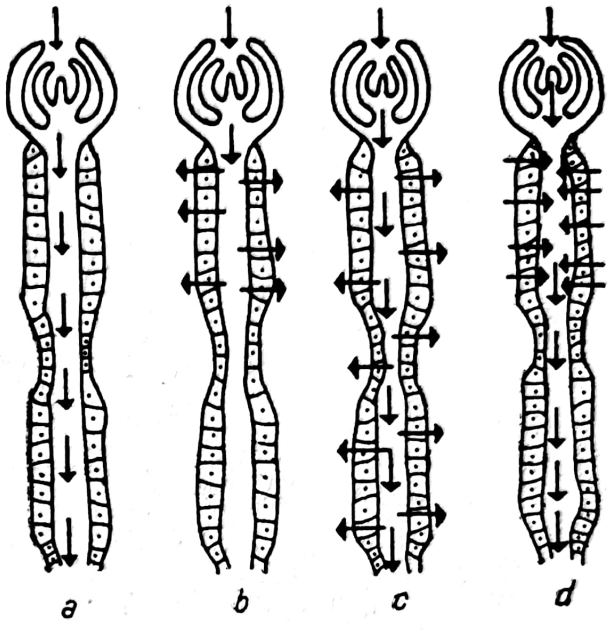


Fig. XIX.5. Funcțiile fundamentale ale rinichiului:
a) filtrare (inulina); b) filtrare și retroresorbție în tubul proximal (glucoza); c) filtrare și retroresorbție în tubii proximal și distal (uree); d) filtrare și excreție tubulară (Diodrast) — (adaptare după Rapoport).

Tabelul XIX.1

Permeabilitatea membranei glomerulare pentru substanțe cu diferite greutăți moleculare

Substanțe	Greutatea moleculară	Raportul F/P
Insulina	5 500	1,00
Mioglobina	17 000	0,75
Hemoglobina	68 000	0,03
Albumina serică	69 000	0,01

Aproximativ 180 litri de ultrafiltrat de plasmă trece din glomeruli în tub, de unde se resorb cca 179 litri de apă, 1 200 g clorură de sodiu, 275 g bicarbonat, 180 g glucoză și alți constituenți filtrabili. Formarea filtratului glomerular este asigurată prin presiunea eficace de filtrare. Aceasta este

Scanned with OKEN Scanner

rezultanta a trei componente: presiunea hidrostatică intracapsulară (75 mm Hg); presiunea coloid-osmotică, determinată de proteine sau presiunea osmotică a lui Starling (30 mm Hg) și contrapresiunea intracapsulară (10 mm

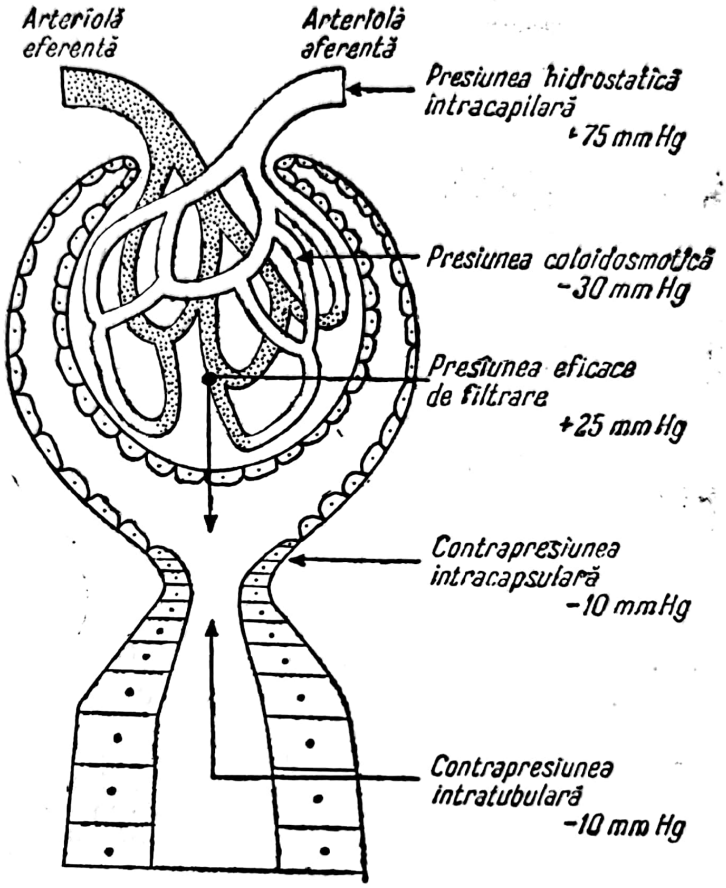


Fig. XIX.6. Mecanismul formării filtratului glomerular.

Hg) la care se adaugă încă 10 mm Hg corespunzător contrapresiunii intratubulare (fig. XIX.6). Presiunea eficace de filtrare este egală cu 25 mm Hg și se obține prin următorul calcul simplu:

$$75 \text{ mm Hg} - (10 + 30 + 10 \text{ mm Hg}) = 25 \text{ mm Hg}.$$

Modificarea condițiilor hemodinamice are consecințe imediate asupra filtratului glomerular. Dacă presiunea arterială scade sub 99 mm Hg, coboară și presiunea intracapsulară. Cînd aceasta atinge 30 mm Hg se stabilește anuria. Studiile electronomicroscopice privitoare la trecerea proteinelor marcate prin membrana bazală glomerulară, confirmă participarea fenomenelor de difuzie la procesul de filtrare glomerulară. Tubul urinifer transformă urina primară definitivă prin procese în dublu sens: reabsorbția anumitor constituenți și secreția unor componente ce provin din țesutul interstițial renal.

4.2. RESORBȚIA TUBULARĂ

Resorbția substanțelor din ultrafiltratul glomerular se face la nivelul tubilor renali în două moduri: activ, prin mecanism ATP-dependent, deci cuplat cu procese producătoare de energie sau pasiv, prin diferențe de concentrație sau de potențial electric.

Scanned with OKEN Scanner

a) *Transportul activ* are o cinetică de saturare analoagă cu aceea a reacţiilor enzimatice (Michaelis-Menten). Din această cauză substanţele se resorb numai pînă la o anumită limită. Procesul se realizează pe baza existenţei unor sisteme de tipuri diferite: cu specificitate absolută de substrat (cazul ionilor Na^+), cu specificitate de grup (glucoza, fructoza, galactoza, xiloza), cu viteze maxime de trecere diferite sau deosebindu-se prin K_m (constanta Michaelis) pentru diferitele substraturi. În mod analog cu sistemele enzimatice, mecanismul de transport activ poate fi inhibat competitiv sau necompetitiv. Componentele resorbite pot fi grupate în două categorii: a) substanţe resorbite activ, transportate contra gradientului lor de concentraţie (deoarece în ultrafiltrat ele au o concentraţie mai ridicată decît în plasmă), printr-un proces energetic ATP-dependent. Din această categorie fac parte: glucoza (şi alte glucide), aminoacizii, Na^+, K^+, ionii de Ca^{++}, Mg^{++}, ionii fosfat, sulfat, vitamina C, acidul uric. O caracteristică a substanţelor resorbite activ este existenţa aşa-numitului „prag de eliminare", adică a unei concentraţii sanguine a substanţei respective, dedesubtul căreia nu are loc eliminarea sa prin urină. Exemplul cel mai evident de substanţă cu prag este glucoza, ce nu trece în urină decît după ce concentraţia sanguină depăşeşte 150 mg % (sau chiar 200 mg %). Acest prag pentru glucoză creşte cu vîrsta. Analogia dintre cinetica de saturare a transportului activ şi aceea a reacţiilor enzimatice are la bază existenţa mecanismelor enzimatice ce intervin în resorbţia tubulară activă. Se pare că resorbţia aminoacizilor, a Na^+ şi K^+ se face sub influenţa unor mecanisme enzimatice, localizate în special în tub. Glucoza este resorbită printr-un proces activ de fosforilare.

Carbonicanhidraza intervine în reglarea echilibrului acido-bazic; glutaminaza, glutamatdehidrogenazele, aminoacidozaminazele şi transaminazele intervin în reglarea producerii de amoniac şi cetoacizi la nivelul rinichiului.

b) *Transportul pasiv.* În acest mod se resoarbe în tubul contort proximal 3/4—4/5 din apa ultrafiltratului glomerular, precum şi ionii Cl^- în tubul contort proximal, distal şi în ansa ascendentă Henle. Procesul are un caracter obligatoriu (datorat masivei retroresorbţii active a ionului Na^+).

Există şi substanţe care nu sînt resorbite în tub, nici activ, nici pasiv şi care nu au prag de eliminare. Ele sînt doar filtrate, aşa cum este cazul creatininei endogene, ce nu apare în lichidul de resorbţie.

4.3. SECREŢIA TUBULARĂ

Prin îndeplinirea acestei funcţii, se produc la nivelul tubilor substanţe ce apar în urină, fără ca ele să fi existat în ultrafiltratul glomerular sau sînt prezente într-o concentraţie mai mare decît ar fi fost îndreptăţită de concentraţia lor în urina primară. Din prima categorie face parte acidul hipuric, sau alte substanţe aromatice conjugate, iar din cealaltă grupă pot fi menţionaţi ionii de K^+, H^+ şi unele medicamente (penicilinele), paraminohipuratul (PAH).

Localizarea proceselor renale a fost studiată prin cercetări bazate pe micropuncţie (Richards). S-a arătat că în tubul contort proximal osmolaritatea lichidului tubular nu se schimbă, iar 3/4 din urina primară este retroresorbită şi că tot la acest nivel se produc retroresorbţia glucozei şi a ionilor de K^+, eliminarea paraminohipuratului şi roşului de fenol. În tubul contort distal sînt localizate procesele de diluţie şi concentrare a urinei, acidifierea urinară, eliminarea de K^+ şi secreţia de amoniac.

Scanned with OKEN Scanner

5. EXCREŢIA URINARĂ A COMPONENTELOR SANGUINE

5.1. COMPONENTE MINERALE

5.1.1. APA

Aproximativ 80—85% din apa ultrafiltratului glomerular se resoarbe prin mecanism pasiv, ca un proces „obligatoriu" consecutiv retroresorbţiei active a Na^+, fără schimbarea osmolarităţii. În ramura descendentă a ansei Henle apa pătrunde în mediul înconjurător iar lichidul intratubular devine hiperosmotic. În ramura ascendentă a ansei Henle se resoarbe activ o anumită cantitate de Na^+, avînd ca urmare o diluare a lichidului urinar, cu scăderea presiunii osmotice. La nivelul tubului contort distal şi al acelui colector, apa se reabsoarbe activ, cu o intensitate variabilă, reglată hormonal, în principal prin acţiunea vasopresiunii sau a hormonului antidiuretic post-hipofizar. Existenţa unui ţesut interstiţial puternic hiperosmotic în regiunea medulo-papilară, face posibilă o mare concentrare a urinei în tubul colector, fără intervenţia mecanismului de transport activ.

5.1.2. EXCREŢIA IONILOR DE SODIU ŞI DE CLOR

Numai 1% din ionul Na^+ existent în ultrafiltratul glomerular este excretat în urină, fapt care arată intensitatea procesului de resorbţie activă (contra gradientului de concentraţie) a acestui cation. Sînt trei zone de resorbţie a ionilor de Na^+ şi anume: zona principală este tubul contort proximal unde se resoarbe 85% din totalul ionilor de sodiu. Concomitent se resoarbe şi apa, aşa încît procesul este izoosmotic. Celelalte zone de resorbţie mai reduse sînt: a) ramura ascendentă a ansei Henle; b) tubul contort distal şi cel colector. La acest nivel se produce un schimb între ionii Na^+ ce trec în

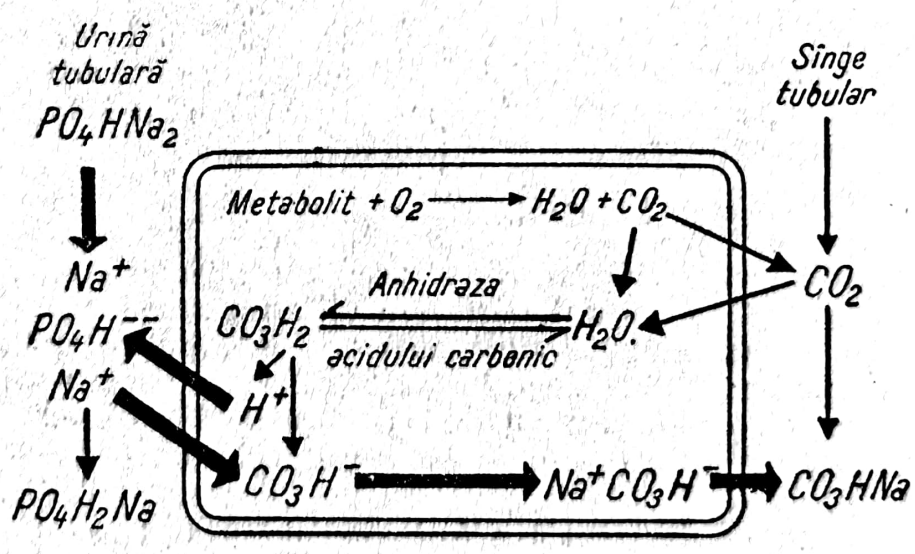


Fig. XIX.7. Acţiunea anhidrazei carbonice în reglarea schimbului protonic (H^+ cu ioni Na^+).

interstiţiu, contra ionilor de H^+ şi K^+ şi NH_4^+ ce intră în lumenul tubular. Această reabsorbţie cu schimb ionic reglează excreţia urinară a sodiului. Concomitent cu resorbţia ionilor de Na^+ se face — în mod pasiv — şi aceea

Scanned with OKEN Scanner

a ionilor de Cl^- (resorbiţi 99%), precum şi a unei cantităţi mai reduse de ioni bicarbonici — CO_3H^- — (vezi fig. XIX.2). Ionii Cl^- eliminaţi, echilibrează electric nu numai cationii Na^+ ci şi K^+, Ca^{2+}, NH_4^+. Schimbul ionic cu K^+ de la nivelul tubului contort distal este principal reglat prin aldosteron care favorizează intrarea Na^+ în celulă şi excreţia de K^+. Schimbul ionic cu H^+ este reglat prin nivelul cantităţii de protoni proveniţi din disocierea H_2CO_3 sub acţiunea anhidrazei carbonice din celulele tubulare (fig. XIX.7). De altfel, prin acest mecanism ionul Na^+ intervine în reglarea echilibrului acido-bazic al organismului.

Ionul de Na^+ este excretat prin urină cînd debitul de filtrare este crescut sau reabsorbţia din tubul contort proximal insuficientă.

5.1.3. EXCREŢIA POTASIULUI

Nivelul urinar al K^+ de care depinde homeostazia acestui cation în organism, este reglat prin două procese contrarii: resorbţia şi secreţia. Totalitatea ionilor K^+ din ultrafiltratul glomerular, este resorbită în tubul controt proximal. La nivelul tubului contort distal se produce secreţia de K^+ cu schimbul ionic menţionat (Na^+ resorbit). În acest schimb ionii K^+ sînt în competiţie cu ionii H^+. În situaţii cînd nivelul K^+ intracelular este ridicat, schimbul ionilor Na^+ resorbiţi se va face contra K^+ ce ies în lumenul tubular, avînd ca urmare scăderea aciditătii urinare exprimate prin creşterea pH-ului. În situaţii inverse, schimbul se face contra H^+ cu creşterea aciditătii urinare exprimată prin scăderea pH-ului. Prin acest mecanism se manifestă relaţia dintre excreţia potasiului şi reglarea echilibrului acido-bazic.

5.1.4. EXCREŢIA IONULUI DE CALCIU

În partea terminală a tubului contort proximal se resoarbe 95% din calciul ultrafiltrabil din plasmă ce traversează filtrul glomerular, trecînd în urina primară. Există un oarecare paralelism între excreţia de Ca^{++} şi cea de K^+ şi o competiţie între schimbarea de K^+ şi ionii de Ca^{++} şi a celor de H^+. În mecanismul absorbţiei calciului se discută intervenţia unei ATP-aze Ca^{++} activată, ce s-ar comporta ca o proteină transportoare de Ca^{++}. Resorbţia tubulară a Ca^{++} este diminuată de hormonul de creştere antehipofizar.

5.1.5. EXCREŢIA BICARBONAŢILOR ŞI A IONILOR FOSFAT ŞI SULFAT

În condiţii normale ionul bicarbonic din ultrafiltratul glomerular, este aproape total resorbit de-a lungul tubului urinifer. O resorbţie suplimentară — dependentă de pH-ul intraluminal — se produce la nivelul tubului contort distal. Excreţia de bicarbonat este dependentă, atît de nivelul concentraţiei sale sanguine — pragul de eliminare fiind 25—27 vali/ml* — cît şi de bilanţul dintre cantitatea de bicarbonat filtrată prin glomerul şi schimbul de H^+ ce se petrece la nivelul tubului contort distal. În acest mecanism intervine şi anhidraza carbonică. Dacă presiunea parţială a CO_2 este crescută în celulele tubu-

* vali = miliechivalenţi (mEq)

Scanned with OKEN Scanner

lare se produce trecerea acestuia în acid carbonic, sub acţiunea anhidrazei carbonice iar, ca urmare a disocierii acestui acid, o creştere a ionilor de H^+. Prin schimb ionic Na^+ va fi fixat ca bicarbonat în celule, iar ionii H^+ vor trece în urină. Dacă presiunea parţială a CO_2 este scăzută, în celule intră ioni de H^+ ce pot fi schimbaţi cu ionul Na^+ şi ca urmare, rezerva alcalină de bicarbonat celular se mişcorează concomitent (vezi fig. XIX.7).

Fosfaţii din urina primară sînt resorbiţi în proporţie de 85—90% în tubul contort proximal (cu variaţii circadiene). În cursul excreţiei fosfaţilor anionul HPO_4^{2-} trece în radicalul fosfat acid $H_2PO_4^-$ datorită schimbului unui ion de H^+ contra unui ion de Na^+, mecanism ce contribuie la reglarea renală a echilibrului acido-bazic şi la economisirea de baze fixe. Retroresorbţia fosfaţilor este mărită prin vitamina D şi hormonul de creştere antehipofizar şi scăzută prin parathormon şi tirocalcitonină.

Sulfaţii se resorb total în tubul contort proximal.

5.1.6. EXCREŢIA AMONIACULUI URINAR

Amoniacul se formează în segmentul distal al tubului urinifer, avînd ca sursă principală de amoniac funcţia amidică a glutaminei (60% din amoniac), restul provenind din: N-aminic al aminoacizilor. Intervin două enzime (deja menţionate): glutaminazele I şi II ce acţionează asupra glutaminei şi aminooxidaza, care intervine în dezaminarea celorlalţi aminoacizi. Excreţia amoniacului creşte cu aciditatea urinei, el fiind eliminat sub formă de săruri de amoniu ale acizilor prezenţi în urină.

5.1.7. EXCREŢIA IONILOR DE HIDROGEN

Acidifierea urinei primare (al cărui pH este alcalin) se petrece la nivelul tubului contort distal prin mecanismul de „schimb ionic" menţionat. Datorită acestui mecanism are loc şi o cruţare a cationului de Na^+, necesar neutralizării tendinţelor acidifiante. Ionul H^+ este produs, cum s-a arătat deja, prin acţiunea anhidrazei carbonice, în reacţia reversibilă de hidratare a CO_2:

$$CO_2 + H_2O \rightleftharpoons H_2CO_3 \rightleftharpoons H^+ + HCO_3^-$$

Cantitatea de CO_2 necesară reacţiei provine din activitatea metabolică a tubului urinifer din care rezultă şi ATP. Acesta este rezervorul energetic de care depind mecanismele de transport activ prin care se face schimbul ionic. Prin excreţia ionilor de H^+, rinichiul participă împreună cu plămînul la păstrarea echilibrului acido-bazic al sîngelui (fig. XIX.8).

5.1.8. REGLAREA ECHILIBRULUI ACIDO-BAZIC ÎN TUBUL CONTORT DISTAL

Această acţiune se realizează prin trei mecanisme tubulare: a) excreţia radicalilor acizi liberi, acizi organici ca: acetil-acetic, β-hidroxibutiric, piruvic, citric. Aciditatea tubulară este de ordinul 20—30 mM/24 ore; b) eliminarea fosfaţilor monometalici, proveniţi din fosfaţii dimetalici (din plasma sanguină), avînd ca rezultat recuperarea unui ion de Na^+ pe molecula excretată; c) formarea amoniacului care înlocuieşte în urină bazele fixe ce rămîn în sînge.

Scanned with OKEN Scanner

Ionul NH^+ se substituie ionilor de Na^+ pentru neutralizarea acizilor ce se elimină. Mecanismele de reacţie ce intervin în această reglare sînt redate în fig. XIX.9.

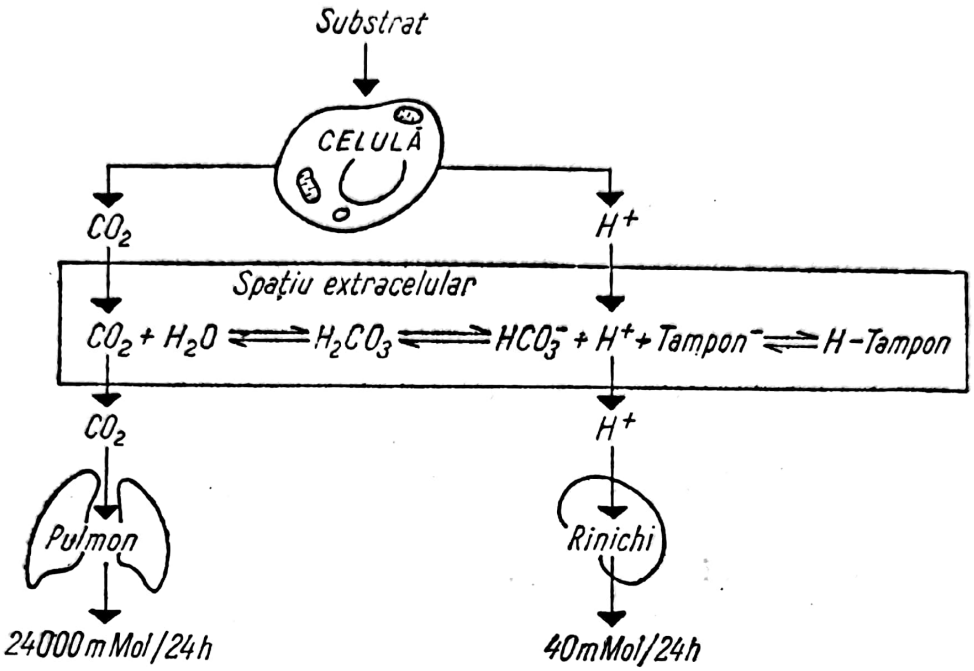


Fig. XIX.8. Cooperarea între plămîn şi rinichi pentru păstrarea echilibrului acido-bazic al sîngelui.

Atîta timp cît rinichiul funcţionează normal, hiperamoniemia constituie un semn obişnuit al acidozei. La nefritici tulburarea acestui mecanism conduce la slaba concentraţie a amoniacului în urină.

5.2. COMPONENTE ORGANICE

5.2.1. GLUCOZA

În stare normală, glucoza din urina primară este reabsorbită activ în prima parte a tubului contort proximal. Mecanismul acestui transfer este activ, ATP-dependent şi deci legat de un mare consum de oxigen. Nu se formează glucozo-6 fosfat şi deci resorbţia ar putea să se facă conform „modelului" propus de Crane (1962) şi perfecţionat pe baze experimentale, pînă la tipul dat de Goldner (1973) în care intervine formarea unui complex ternar:

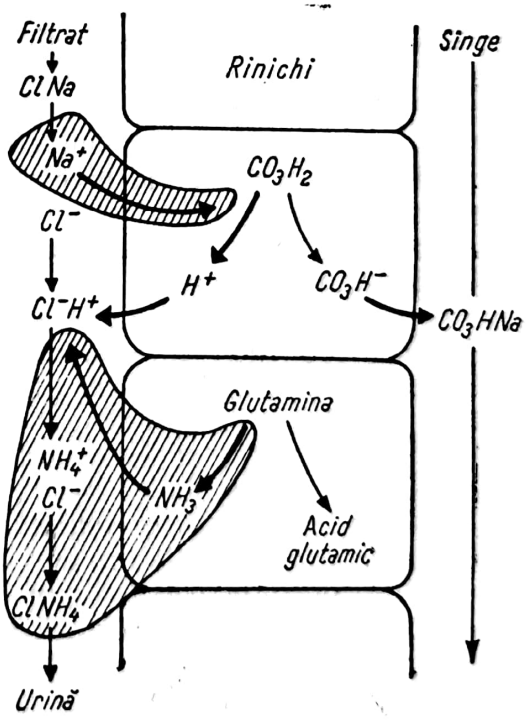


Fig. XIX.9. Substituirea ionilor de Na^+ ioni NH_4^+ pentru neutralizarea acizilor ce se elimină prin urină.

Scanned with OKEN Scanner

transportor-Na^+-glucoză şi acţiunea unei „pompe $Na^+ - Ca^{2+}$“, ATP-dependentă. Transportul glucozei s-ar realiza în trepte, prin legarea glucozei de o proteină transportoare din microvilii marginali în perie a celulelor renale, anume ATP-aza natriu dependentă din celulele tubulare. Mecanismul poate fi blocat prin florizină iar — în condiţii patologice — este tulburat în diabetul renal.

5.2.2. CORPII CETONICI

Sînt în mică proporţie utilizabili ca substrat energetic, la nivelul celulelor renale; cea mai mare parte a lor este eliminată prin filtrare.

5.2.3. AMINOACIZII

Sînt resorbiţi activ în tubul contort proximal, unii aproape total, iar alţii numai într-o proporţie ridicată (cistina, lizina, histidina). Eliminarea în urina definitivă este mai mică pentru aminoacizii din seria naturală L decît pentru cei din seria D. Sînt implicate mai multe sisteme transportoare, iar în interiorul unui sistem dat se pot produce fenomene de inhibiţie competitivă a acizilor aminaţi cointeresaţi. Se presupune că aminoacizii bazici ca: lizina, arginina, ornitina ca şi cistina sînt retroresorbiţi printr-un mecanism comun, în care dispoziţia spaţială a grupărilor cationice NH_3^+ este hotărîtoare. Transportul aminoacizilor pare să fie cuplat cu o mişcare a ionilor de Na^+.

5.2.4. UREEA

Există o difuziune izoosmotică, pasivă, socotită obligatorie a ureei de-a lungul tubului proximal în care se realizează cea mai mare parte a resorbţiei acestei substanţe. Resorbţia medie normală reprezintă 40% din cantitatea conţinută în ultrafiltratul glomerular. De o însemnătate deosebită sînt şi fenomenele ce se petrec la nivelul tubului distal şi a celui colector, corelate cu existenţa unui gradient osmotic corticomedular şi a unui rezervor de uree (depozit), în medulara internă şi regiunea papilară. În situaţii de încetinire a diurezei, ureea difuzează în urină către ţesutul interstiţial iar concentraţia urinară a substanţei scade. În stări de supraîncărcare hidrică, ureea difuzează din „rezervorul“ interstiţial medular în urină, determinînd o creştere a concentraţiei sale urinare (mecanism prin contra curent).

5.2.5. CREATININA

Are o particularitate comună cu unele substanţe nenaturale ce pot fi introduse în sînge pe cale intravenoasă: inulină, manitol, hiposulfit de sodiu. Anume, la concentraţii fiziologice în plasmă, creatinina endogenă, ca şi substanţele menţionate, este filtrată prin glomerul şi excretată prin urină, fără reabsorbţie sau secreţie la nivel tubular. Această particularitate este folosită pentru explorarea funcţională a glomerulului, prin măsurarea filtratului glomerular. Prin ridicarea provocată a creatinemiei, creatinina exogenă cste excretată printr-un proces de secreţie tubulată, supraadăugat celui de filtrare glomerulară.

Scanned with OKEN Scanner

5.2.6. ACIDUL URIC

Este eliminat printr-un proces ai cărui factori de influenţă nu sînt încă bine cunoscuţi.

5.2.7. PROTEINELE

Proteinele a căror trecere în ultrafiltratul glomerular a fost discutată mai înainte, sînt prezente într-o anumită proporţie în urina primară, dar sînt reabsorbite aproape integral în tubul contort proximal. Această situaţie este de altfel expresia particulară a unei aptitudini pe care celulele tubulare o au de a reabsorbi macromoleculele prezente în fluidul intratubular. Cu particule de tuş de China sau coloranţi diverşi s-au obţinut imagini de resorbţie — granulaţii intracelulare (atrocitoză) — sau de secreţie tubulară.

5.2.8. SUBSTANŢE STRĂINE

Eliminarea acestora depinde, în principal, de următorii factori: legarea de proteinele plasmatice transportoare, eliminarea sau retroresorbţia în tubuli, valoarea pH-ului urinar. Un anumit grup de compuşi chimici, de natură diferită, ajunşi în sînge pe cale intravenoasă sau prin ingestie, sînt excretaţi activ de rinichi, datorită unei secreţii tubulare de intensitate variată, ce se supraadaugă filtratului glomerular. Din acest grup fac parte compuşii ce sînt folosiţi pentru explorarea mai mult sau mai puţin specifică a funcţiei tubulare: PSP (fenolsulfonftaleină), PAH (acidul paraminohipuric), penicilina, compuşii organici şi iodaţi (ca diodrastul).

6. DILUAREA ŞI CONCENTRAREA URINEI

Diluarea urinei se petrece în tubul distal. Procesul se sprijină pe mecanisme diverse şi are un caracter obligatoriu, în prima porţiune a acestui tub, independent de faptul că în porţiunea terminală au loc acţiuni de diluare sau concentrare a urinei. Capacitatea de diluţie a rinichiului este limitată, aşa încît se poate vorbi de un maxim desemnat prin T_m (capacitate maximă de diluţie tubulară) pentru apa liberă. Această mărime este de 10 ml/minut şi se supraadaugă în tubul distal lichidului izoton ce vine din tubul proximal. Concentrarea urinei este însă un proces facultativ, reglat prin vasopresină. Lipsa acestui hormon — ca în diabetul insipid — determină eliminarea unei urini foarte diluate. Procesul de concentrare are loc în stare de hidropenie: osmolaritatea urinei ajunge — la om — de patru ori valoarea celei plasmatice. Se produce o diureză obligatorie, independent de compoziţia chimică a substanţelor dizolvate. După teoria lui Wirtz, în medulara renală există un mediu hipertonic care determină retrosorbţia apei urinare din tubul colector. Prin acest proces este provocată hiperosmolaritatea urinei. Pe lîngă acest mecanism, acţionează şi un proces de concentrare prin contra curent, de intrare de Na^+ în tub (fig. XIX. 10). Se admite că sistemul multiplicator în contra curent

Scanned with OKEN Scanner

cuprinde cele două ramuri (ascendentă şi descendentă) ale ansei Henle, tubul colector precum şi ansele capilare ale vaselor drepte (vasa recta). În sistem există două fluxuri paralele şi de sens contrar cu concentraţii diferite.

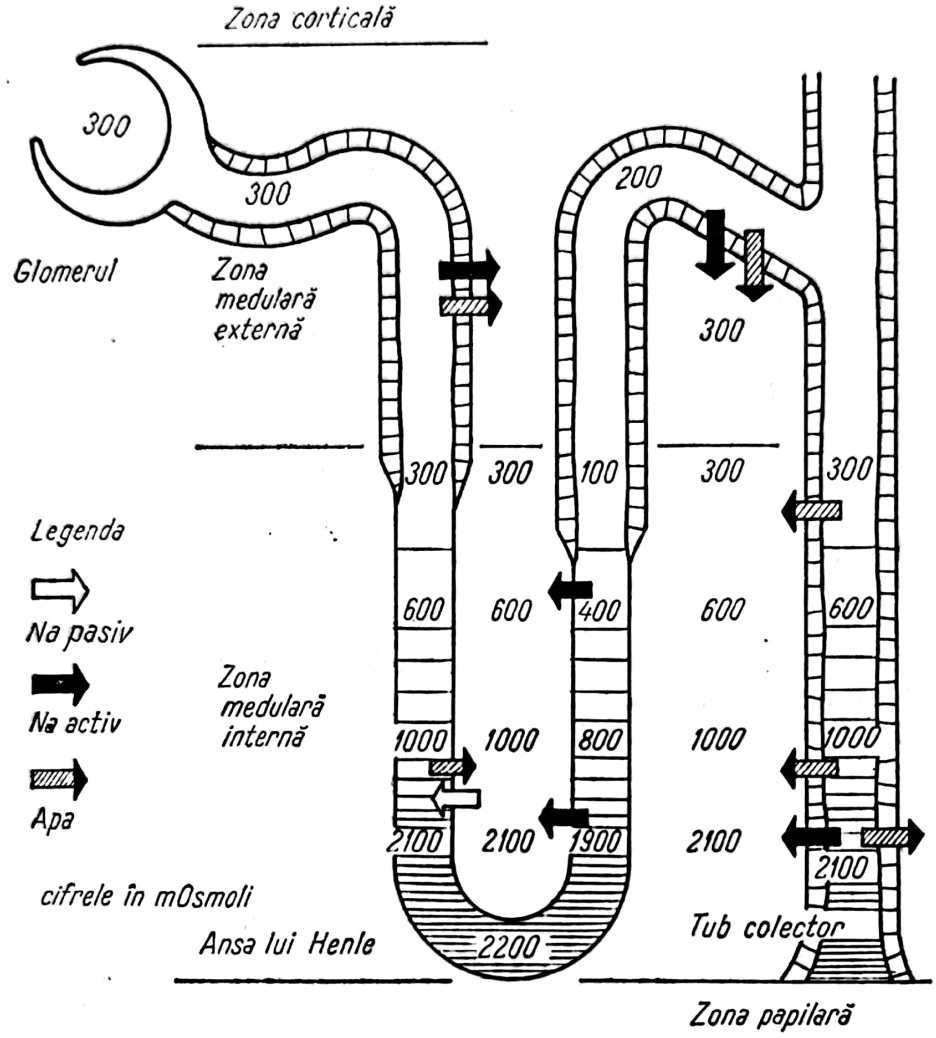


Fig. XIX.10. Sistemul multiplicator, în „contra curent", care determină concentraţia ridicată a ionilor de Na^+ şi a ureii, către papilă (după Rapoport).

Intervenţia mecanismului activ de transfer (Na^+ şi uree) la nivelul ramurilor acestui sistem duce la multiplicarea diferenţei de concentraţie a Na^+. Prin acest sistem mixt, pasiv-activ, se explică concentraţia ridicată a ionilor de Na^+ şi a ureii către vîrful papilei.

7. NOŢIUNEA DE „CLEARENCE" (EPURARE) RENAL

După propunerea lui Van Sleyke, clearence-ul sau coeficientul de epurare al unei substanţe sanguine, eliminate prin rinichi, este exprimat prin raportul dintre debitul urinar al acestei substanţe pe minut şi concentraţia sa în plasmă.

Scanned with OKEN Scanner

El este egal cu volumul de plasmă care este epurat în fiecare minut de o anumită substanţă, ca urmare a travaliului renal. Clearence-ul unei substanţe sanguine, eliminate prin rinichi, este redat prin raportul dintre debitul urinar al acestei substanţe pe minut şi concentraţia sa plasmatică, adică:

$$C = \frac{U \cdot V}{P}$$

în care:

C = clearence (coeficientul de epurare);
U = concentraţia urinară a substanţei, exprimată în mg/ml;
V = volumul de urină emis, în ml/minut;
P = concentraţia plasmatică a substanţei, în mg/ml.

Valorile de clearence se dau în ml de plasmă. Substanţele ce sînt filtrate şi resorbite au o eliminare inferioară cantităţii filtrate. În afară de uree, ce constituie un caz particular, substanţele se clasează în trei categorii din punct de vedere al coeficientului lor de epuraţie (clearence). O *primă categorie*, este alcătuită din substanţe cu structura chimică diferită, printre care se numără inulina, manitolul, hiposulfitul de Na şi creatinina endogenă. Clearence-ul lor normal este de 125—130 ml (±20)/minut, pentru o suprafaţă de 1,70 m^2 şi greutate medie de 70 kg. Substanţele acestea sînt doar filtrate prin glomerul şi nu sînt nici resorbite, nici secretate în tubul urinifer. Ele sînt concentrate în mod identic, ca urmare a resorbţiei unei părţi din apa ultrafiltratului glomerular. Clearence-ul lor este constant şi independent de valoarea concentraţiei lor plasmatice. A *doua categorie* cuprinde majoritatea constituenţilor obişnuiţi ai urinei, ce au un clearence mai mic de 130 ml. Sînt substanţe resorbite la nivel tubular, cantitatea reabsorbită scăzînd debitul tubular. În acest caz: UV=Fl—T în care:

UV = debitul urinar;
Fl = cantitatea filtrată;
T = cantitatea reabsorbită.

Capacitatea de resorbţie T reprezintă o limită maximă ce se poate calcula din relaţia de mai sus, în care T devine T_m.

O a *treia categorie* de substanţe au clearence superior filtratului glomerular, deoarece ele trec şi printr-un proces de secreţie tubulară. Cantitatea secretată se supraadaugă celei deja existente în ultrafiltrat. În această categorie intră: compuşi iodaţi organici (ca diodrastul), acidul paraaminohipuric (PAH) şi antibioticele (ca penicilina). În acest caz $UV = Fl + T_s$ în care:

T_s = cantitatea secretată de tub.

Deoarece şi excreţia tubulară are o limită superioară desemnată ca T_m, cînd capacitatea de saturare este atinsă, $UV = Fl + T_m$.

Din această relaţie se poate calcula: $T_m = UV - Fl$. În practică se calculează uneori T_m al PAH (=78 mg/minut).

În cazul ureii, clearence-ul său de 70 ml traduce reabsorbţia cantităţii de uree ce se găseşte în 55 ml plasmă. Clearence-ul ureii este legat şi de reabsorbţia hidrică şi scade odată cu diminuarea diurezei. În porţiunea terminală

Scanned with OKEN Scanner

a tubului colector, către papilă se produce — după cum s-a arătat — îmbogățirea urinei cu uree și Na^+, prin mecanismul „în contra curent" (ipoteza lui Wirtz).

8. URINA. CARACTERE GENERALE FIZICE ȘI CHIMICE

Prin elaborarea urinei, rinichiul asigură homeostazia volemică și metabolică a organismului. În urina normală se elimină zilnic cca 60 g (50—72 g) substanțe solide, dintre care 10—18 g sînt produse ale metabolismului azotat. În condiții normale se elimină în 24 ore, cca 35 g substanțe organice și 25 g substanțe minerale. Printre substanțele eliminate, afară de cele obligatorii, în mod normal se găsesc și componente ce apar în condiții speciale sau patologice ca: medicamente, metaboliți ai acestora sau substanțe toxice.

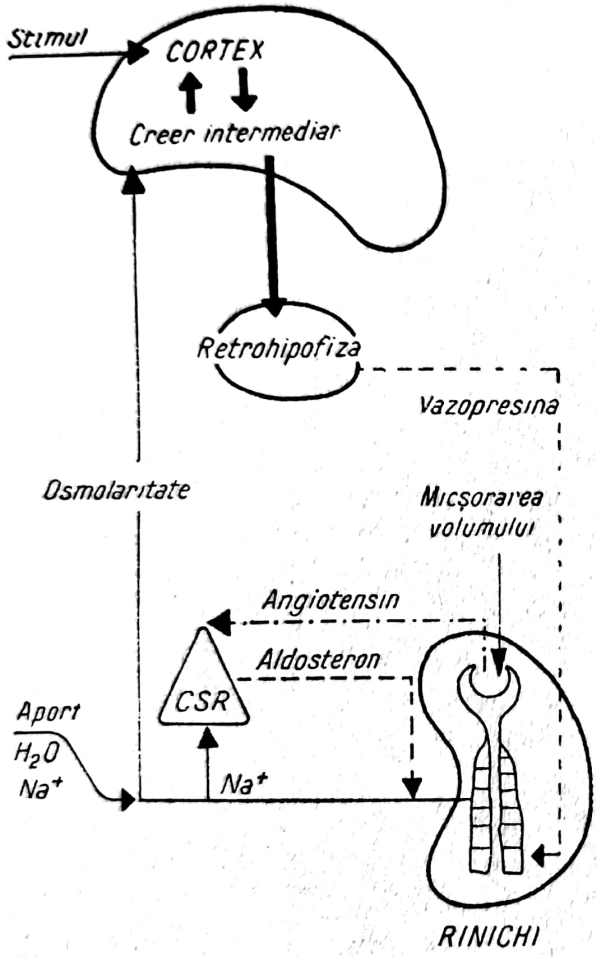


Fig. XIX.11. Reglarea osmotică a urinei prin mecanisme neurohormonale.
CSR=corticala suprarenală.

După cum s-a arătat, atît capacitatea renală de concentrare, cît și cea de diluție sînt limitate. În condiții de hidropenie se elimină puțină urină, foarte concentrată, iar în regimurile cu supraofertă de apă, volumul urinei eliminate este mare și concentrația foarte scăzută. În condiții normale, urinile eliminate în volum redus au osmolaritate ridicată, corespunzînd la aproximativ de cinci ori valoarea celei plasmatice iar în situația inversă — de diluție — valoarea osmolarității atinge 1/5 din cea plasmatică. Zona de variabilitate a osmolarității este foarte largă fiind cuprinsă între 60 și 1 500 mos moli/litru. Domeniul de oscilație al cantității de urină poate varia de la 0,5—25 l/zi (condiții excepționale). Reglarea osmotică a urinei are la bază mecanisme neurohormonale redate în fig. XIX. 11 în care „osmoreceptorii" celulari joacă un rol important. Osmolaritatea crescută a plasmei determină iritația receptorilor, ce pe cale neurohormonală provoacă secreția de vasopresină din retrohipofiză. Inversul se petrece cînd osmolaritatea plasmatică este scăzută.

8.1. CANTITATEA

Cantitatea de urină emisă în 24 ore depinde de ingestia de lichide, de pierderile de apă, prin transpirație și de cantitatea de substanțe excretate

Scanned with OKEN Scanner

în urină. Valorile normale în 24 de ore variază cu vîrsta:

Adulţi şi copii peste	14 ani	1 000—1 600 ml
„	8—14 ani	800—1 400 ml
„	5— 8 „	650—1 000 ml
„	3— 5 „	600— 700 ml
„	1— 3 „	500— 600 ml
„	2—12 luni	400— 500 ml
„	10—60 zile	250— 450 ml
„	3—10 „	100— 300 ml
„	1— 2 „	30— 60 ml

Cantitatea de urină variază cu sexul: la bărbaţi 1 500—2 000 ml/24 ore, la femei 1 200—1 700 ml/24 ore.

Cantitatea de urină mai mare de 2 500 ml/24 ore constituie *poliuria*. Cantitatea de urină scăzută sub 500 ml/24 ore constituie *oliguria*. În mod normal, cantitatea de urină eliminată ziua este mai mare decît cea din timpul nopţii, raportul fiind de 1 : 2 şi 1 : 4. Inversarea raportului — nicturia — este patologică.

8.2. ASPECTUL ŞI MIROSUL

Urina normală este în general limpede. O urină tulbure în momentul emisiunii poate conţine: săruri (uraţi, oxalaţi, fosfaţi sau carbonaţi); mucus, puroi, epitelii, microbi; grăsimi (aspect lăptos). După cîteva ore de şedere, în urina normală se produce un nor fin, „nubecula", alcătuit de mucus şi celule epiteliale descuamate (fără semnificaţie patologică). După mai multe ore se depozitează la rece un precipitat din săruri conţinute în orice urină normală. Diferenţierea orientativă a cauzei tulburelii, ce se produce în momentul emisiunii, se face prin mijloace simple*: prin încălzire dispar uraţii (cu excepţia celor de amoniu): încălzirea cu adăugare de cîteva picături de acid acetic dizolvă fosfaţii, uraţii, carbonaţii (producere de efervescenţă); prin adăugarea de soluţii HCl (12,5%) se dizolvă oxalaţii. Hidroxidul de potasiu (sau NaOH) dizolvă uraţii şi provoacă transparenţa gelatinoasă a urinilor cu puroi. În bacteriuriile cu germeni producători de nitrit (Escherichia coli) se aplică pentru orientare proba cu α-naftilamină şi acid sulfanilic (R. Gries) sau un test rapid de tipul „Nitur" Boehringer.

Mirosul urinei normale este „sui generis" — se poate schimba în cursul infecţiilor urinare ce provoacă un miros amoniacal, în stările de acidoză, cu eliminare de acetonă ce dă urinei miros de esenţă de fructe. Mirosul poate fi modificat şi prin ingestia unor alimente ca: sparanghel, usturoi sau prin administrarea de substanţe ca terebentina şi eucaliptolul.

8.3. CULOAREA

Aceasta depinde de concentraţia şi natura substanţelor dizolvate în urină, în primul rînd de unii pigmenţi ca: urocromul, urobilina şi porfirina, primul fiind principalul factor de colorare. Urina normală are culoare galbenă-deschis pînă la galbenă-aurie, în raport cu ora emisiunii, cea din timpul nopţii fiind mai concentrată, are o culoare mai închisă.

---

* Pentru detalii tehnice se recomandă consultarea volumului „Metode de laborator de uz curent" (partea II-a) apărută sub egida MS-ASM, Ed. Medicală, Bucureşti, 1977.

Scanned with OKEN Scanner

Culoarea urinei poate fi modificată prin diferite substanţe pe care le conţine, de natură endogenă sau exogenă. Principalele substanţe care pot modifica culoarea urinei sînt:

a) *substanţe endogene*:

— sîngele: culoare roşie (nuanţă de spălătură de carne), brună sau maronie;

— porfirinele: culoare roşie sau brun-roşcată;

— pigmenţii biliari (bilirubina): culoare galbenă-verzuie sau brună verzuie (ca berea neagră), cu spumă galbenă verzuie;

— hemoglobina, melanina: culoare brună-neagră;

— alcaptonul: culoare brună spre negru, la scurt timp după emisiunea urinei.

b) *substanţe exogene*:

— albastru de metilen: culoare verde;

— piramidonul: culoare roşie (datorită acidului rubazonic);

— compuşi fenolici: culoare brună.

Urinile care conţin grăsimi în cantitate apreciabilă au aspect lăptos.

8.4. DENSITATEA ŞI VÎSCOZITATEA URINEI NORMALE

S-a subliniat raportul de proporţionalitate inversă dintre volumul şi densitatea urinei (cu excepţia urinei provenite de la diabetici care au poliurie şi elimină în acelaşi timp cantităţi mari de glucoză). Greutatea specifică a urinei poate oscila între 1 001—1 035, fiind dependentă de cantitatea de substanţe dizolvate. În condiţii patologice, rinichiul poate pierde capacitatea de concentrare cu scăderea densităţii (hipostenurie). Pierzînd apoi şi capacitatea de diluare, densitatea urinei oscilează în jurul valorii de 1 010 (izostenurie) corespunzătoare densităţii sîngelui dezalbuminat. Densitatea poate fi măsurată prin următoarele procedee: cu picnometrul (balanţa Mohr—Westphal) sau în practica obişnuită cu urodensimetrul (areometru special) gradat pentru intervalul 1 000—1 040, calibrat la temperatura de 15°C. Dacă temperatura urinei diferă de aceea de calibrare se face o corecţie, numai dacă diferenţa de temperatură în plus sau în minus, depăşeşte 3°C.

Densitatea variază în paralel cu scăderea punctului de îngheţare a urinei. Acesta este determinat prin crioscopie (Beckman), cu fixarea aşa-numitului „delta" Δ, proporţional cu presiunea osmotică, datorată — în special — clorurei de sodiu şi ureii. Delta crioscopică oscilează între —0,59°C şi 2,24°C.

Vîscozitatea urinei oscilează între 1,02—1,20, tinzînd către limita superioară cînd urina conţine elemente patologice (albumină, sînge, leucocite sau cilindrii).

Tensiunea superficială în valoare de 64—69 dine, este mai mică decît a apei şi scade în prezenţa substanţelor tensioactive, de tipul acizilor biliari, proprietate folosită pentru detectarea acestora prin reacţia Hay (cu floare de sulf).

8.5. REACŢIA URINEI NORMALE

Aceasta este exprimată obişnuit prin pH-ul său, depinzînd de dietă. O alimentaţie bogată în proteine scade pH-ul urinar. Pentru un regim mixt

Scanned with OKEN Scanner

obişnuit urina din 24 de ore are reacţie uşor acidă, valorile variind între 5—7; în general, în jur de 5,8. Aciditatea de titrare (stabilită cu soluţie alcalină 0,1 N sau prin titrare electrochimică) corespunde în mod normal la 30—40 m vali de ioni H^+**. Ea exprimă valoarea totală a protonilor urinari, inclusiv a celor legaţi de fosfaţi şi acceptorii organici. Aciditatea urinară este determinată în principal de trei factori: acizii organici eliminaţi în urină, excreţia fosfaţilor sub formă de fosfaţi acizi, eliminarea unei fracţiuni importante a acizilor sub formă de săruri de amoniu. Valoarea pH-ului urinar este determinată, în special, de raportul concentraţiilor $\frac{NaH_2PO_4}{Na_2HPO_4}$.

9. COMPOZIŢIA CHIMICĂ A URINEI NORMALE

Această compoziţie cuprinde atît substanţe organice, cît şi substanţe anorganice. În ansamblu, ele sînt prezentate în tabelul XIX. 2, ce conţine cei mai importanţi constituenţi ai urinei cu intervalul lor de variaţie cantitativă în 24 de ore.

Tabelul XIX. 2

Compoziţia chimică a urinei normale

Substanţa	Intervalul de variaţie a concentraţiei/24 ore
Componente minerale	
Anioni	
Cl^-	5,0—9,5 g sau 140—260 m vali
SO_4^{2-}	1,4—3,5 g sau 30— 75 m vali
$H_2PO_4^-$ şi HPO_4^{2-}	0,5—4,5 g sau 500—140 m vali
Cationi	
Na^+	2,3—6 g sau 100—260 m vali
K^+	1,4—3,5 g sau 35— 90 m vali
NH_4^+	0,4—1,0 g sau 20— 60 m vali
Ca^{2+}	0,1—0,5 g sau 5— 25 m vali
Mg^{2+}	0,1—0,5 g sau 5— 40 m vali
Componente organice	
Uree (dependentă de aportul de proteine)	20—35 g
Acidul uric (dependent de aportul alimentar)	350—2 000 mg
Creatinina	1—2 g
Creatina	60—150 mg
Aminoacizii	1—3 g
Glucoza	pînă la 200 mg
Corpii cetonici	3—15 mg
Acid Δ-aminolevulinic	sub 7 mg
Coproporfirine	sub 280 μg
Uroporfirine	sub 20 μg
Proteine	3—40 mg
Amilaza	100—2 000 unităţi/l

*) După unii autori limita superioară este chiar de 60 m vali/24 h.

Scanned with OKEN Scanner

9.1. COMPONENTE MINERALE

9.1.1. CLORUL

Se elimină sub formă de cloruri sau mai ales de NaCl care are un prag de eliminare foarte ridicat, 340 mg la 100 ml ultrafiltrat. Concentrația ionilor de clor urinar este hotărîtă prin regimul alimentar. În regim declorurat resorbția tubulară fiind aproape completă, eliminarea de NaCl este efectiv anulată. Eliminarea poate fi influențată și de aportul hidric și de exercițiul muscular. În condiții patologice concentrația clorului urinar poate înregistra variații corelate cu tulburări ale mecanismului de resorbție tubulară. Acestea se întîlnesc în cursul unor nefrite, în unele boli infecțioase (ca pneumonia), cînd eliminarea clorurilor scade.

9.1.2. FOSFORUL

Acest nume (generic) este atribuit radicalilor fosforici. De aceea se spune că fosforul se elimină în urină sub formă de fosfați alcalini și alcalinoteroși sau ca fosfați de amoniu. Cea mai mare parte este constituită de fosfații monometalici. Pragul de eliminare este de cca 2 mg/100 ml. Eliminarea fosfatului anorganic descreşte cu vîrsta. Originea fosfaților urinari este dublă: exogenă (alimentară) și endogenă (din degradarea fosfolipidelor și a nucleoproteinelor). Există o legătură strînsă între eliminarea de P și aceea de Ca^{++}. Starea de acidoză favorizează liberarea acidului fosforic de origine protidică și eliminarea sa urinară. Excreția de fosfor crește și în unele afecțiuni osoase ca osteomalacia, precum și în rahitismul renal și hiperparatiroidie.

9.1.3. SULFUL

Se elimină în urină sub trei forme: sulfații minerali, esterosulfații și sulful neutru. Sulful de origine exogenă este în cantitate mică, majoritatea fiind endogen și provenit aproape exclusiv din oxidarea in vivo a sulfului cisteinic sau metioninic. Sulfoconjugarea este unul din mecanismele de detoxifiere a organismului (vezi capitolul privind biochimia ficatului). O parte din sulfații minerali esterifică fenoli sau alte produse ale putrefacției bacteriene intestinale (indol, scatol). Fracțiunea formată din săruri și esteri sulfurici constituie sulfatul acid, iar restul sulfului eliminat reprezintă sulful neutru, ce cuprinde acizii mercapturici, peptide și mucoproteine bogate în aminoacizi cu sulf, precum și produși ai catabolismului lor, mercaptani și sulfuri. Sulful se elimină la un nivel aproape constant (ca și creatinina).

9.1.4. CATIONII Na^+, K^+, Ca^{2+}, Mg^{2+}

Așa cum s-a arătat, 99% din ionii de Na^+ ai filtratului primar sînt reabsorbiți, iar restul se elimină. Eliminarea de Na^+ depinde în mare măsură de aportul alimentar (ca și a Cl^-). Ea este reglată prin activitatea cortico-suprarenalei. Hormonii coticoizi, în special aldosteronul, stimulează reabsorbția sodiului și o scade pe aceea a potasiului. Excreția de K^+ este foarte influențată

Scanned with OKEN Scanner

de variaţiile echilibrului acido-bazic al organismului şi de activitatea anhidrazei carbonice din celulele tubulare. Eliminarea ionilor Ca^{2+} şi Mg^{2+} se modifică în patologia osoasă, sau cînd metabolismul osului este implicat în procesul morbid.

9.1.5. SĂRURILE AMONIACALE

Eliminate prin urină sînt o măsură a capacităţii renale de reglare a echilibrului acido-bazic. Excreţia urinară a sărurilor amoniacale scade la nefritici.

9.2. COMPONENTE ORGANICE

9.2.1. UREEA

Este compusul azotat cel mai abundent în urină, reprezentînd 80—85% din azotul total urinar. Ea este produsul ultim de degradare a proteinelor (vezi Cap. XIV). Eliminarea este în funcţie de vîrstă şi de alimentaţia bogată în proteine. Patologic, se produc hiperazoturii în boli febrile, în diabetul pancreatic, în diabetul azoturic. Hipoazoturie cu diminuarea excreţiei ureice se produce prin scăderea ureogenezei hepatice, ca în atrofia galbenă acută a ficatului, ciroză, cancer hepatic în faza terminală, sau prin tulburarea eliminării renale (nefrite acute, nefrite cronice cu azotemie, nefrite toxice mercuriale, saturniene). În stările acidozice o parte din elementele azotate ureogene sînt utilizate pentru formarea amoniacului.

Metode de dozare. Se folosesc aceleaşi variante principiale ca pentru dozarea ureii în sînge: metoda cu urează şi reactiv Berthelot, sau cu diacetilmonoximă şi ion feric (vezi Cap. XIV).

9.2.2. CREATININA

Eliminarea creatininei este relativ constantă şi total independentă de alimentaţie. Originea sa metabolică este creatin-fosfatul, cu rol important în contracţia musculară. Raportul creatininei urinare către creatina totală tisulară este 2 : 100 (Borsook şi Dubnof). Eliminarea creatininei urinare scade în hipertireoză (prin inhibiţia fosfocreatinkinazei CPK) şi în distrofia musculară progresivă (prin micşorarea sintezei creatinei).

9.2.3. CREATINA URINARĂ

Este mai variabilă şi în concentraţie mică la adultul normal (0,060—0,150 g/24 ore). Concentraţia sa este mult mai ridicată la copil, la care eliminările urinare pot egala pe acelea ale creatininei. La femeie se observă creşteri catameniale ale creatinuriei, în timpul sarcinii şi în perioada de regresie uterină post-partum. Eliminări crescute ale creatinei în urină se produc şi în hipertireoză sau în atrofia musculară.

9.2.4. ACIDUL URIC

Este produsul final al metabolismului purinic. Cantitatea eliminată cuprinde fracţiunea endogenă, de origine metabolică, la care se adaugă cea exogenă, alimentară. Se elimină în stare liberă şi sub formă de săruri, uraţii

Scanned with OKEN Scanner

alcalini. Acidul uric este foarte puţin solubil dar prezenţa sărurilor alcaline — în special a fosfaţilor — îi măresc solubilitatea. Alcalinizarea urinei prin alimentaţie bogată în baze fixe (legume) măreşte solubilitatea acidului uric prin transformarea sa în uraţi alcalini solubili. Urina conţine o cantitate apreciabilă de acid uric. Această cantitate reprezintă o constantă individuală, ce se menţine chiar în cursul unui regim lipsit de purine. Eliminarea orară a acidului uric are o ritmicitate circadiană cu două maxime. O masă abundentă, chiar lipsită de purine, determină o excreţie crescută de acid uric. În gută — boală caracterizată prin depunerea uraţilor în ţesuturi, sub formă solidă — eliminarea acidului uric exogen, este încetinită. În această boală metabolică, formarea acidului uric este mai intensă decît la normal şi se consideră că ar rezulta direct din nucleotide, înaintea încorporării lor în acizii nucleici. Tulburarea metabolică se asociază frecvent cu insuficienţa funcţiei renale. În momentul accesului de gută, cu depunerea uraţilor solizi la nivelul cartilajelor, se produce o creştere a excreţiei urinare de acid uric endogen, chiar dacă regimul este lipsit de purine. Această bruscă descărcare de acid uric în urină, coincide cu o creştere a depozitării sale la nivelul cartilajelor, producînd criza dureroasă de gută. Eliminarea acidului uric poate fi scăzută în insuficienţa renală. Unele medicamente scad clearence-ul uraţilor (acetazolamida, clorotiazida, furozemidul, spironolactona). Tratamentul cu substanţe potenţial nefrotoxice (gentamicina, fenotiazina) pot determina hiperuricemii cu scăderea eliminării urinare a acidului uric. Creşteri ale eliminării urinare a acidului uriç se produc în stări de hipercatabolism al nucleoproteinelor celulare (tratamente radioterapice, leucoze, chimioterapia cu busulfan, mercaptopurină, metotrexat, vincristină).

9.2.5. AMINOACIZII

În urină se găsesc, în formă liberă, aproape toţi aminoacizii care intră în constituţia proteinelor, precum şi un număr de aminoacizi noi, derivaţi din cei cunoscuţi (tabel XIX-3). Ordinul de mărime al eliminării pentru fiecare dintre ei, este cuprins (pentru cei mai mulţi) între 5 şi 30 mg/24 ore. Urina normală poate să conţină 1 g—3 g aminoacizi. Un procent ridicat al aminoaciduriei (85%—89%) este reprezentat prin 9 aminoacizi: glicocolul, histidina, 1-metilhistidina, glutamina, serina, 3-metilhistidina, alanina, acidul β-aminobutiric (BAIBA). În mod constant se găsesc: glicocolul, tirozina, leucina, histidina; preponderenţi cantitativ fiind: glicocolul (cca 140 mg/24 ore) histidina (cca 210 mg/24 ore), taurina (peste 100 mg/24 ore). Prin procedee microbiologice, cromatografice şi electroforetice s-au pus în evidenţă şi aminoacizii derivaţi din cei care intră în constituţia proteinelor (menţionaţi mai sus). Se găsesc şi unii aminoacizi în stare combinată, ca glicocolul în acidul hipuric, prolina şi hidroxiprolina în stare de dipeptide sau tripeptide, glutamina ca fenilacetilglutamină. Se poate determina clearence-ul diferiţilor aminoacizi, ce pot fi clasaţi, în trei categorii, din acest punct de vedere. O primă categorie cu clearence>2 ml pe minut cuprinde: histidina, taurina, glicocolul, serina, acidul aspartic, care au concentraţia urinară superioară celei plasmatice. O altă categorie: arginina, lizina, alanina, leucina, valina, prolina au clearence-ul de 1 ml/minut şi ca urmare o concentraţie urinară de două ori mai mică decît cea plasmatică. Un al treilea grup cuprinde: tirozina, izoleucina şi cistina. Acest grup are un clearence intermediar.

Scanned with OKEN Scanner

Tabelul XIX.3

Aminoacizi liberi în urina normală; concentraţie în mg/24 ore

Aminoacidul	Copii (9–24 luni)		Bărbaţi		Femei	
	Valoare medie	Limite	Valoare medie	Limite	Valoare medie	Limite
1	2	3	4	5	6	7
Alanina	10	5–15	22	5–32	24	9–44
—β-Alanina	0,3	—	6	3–10	3	2–9
—α-Aminoadipic	0,5	—	8	5–13	4	0–13
—α-Aminobutiric	0,3	—	—	—	—	—
—γ-Aminobutiric	0,3	—	—	urme	—	urme
—β-Aminoizobutiric (BAIBA)	5	0–9	22	6–37	29	10–52
Arginina	0,5	—	6	0–14	4	0–11
Acid asparaginic	—	<4	8	3–29	4	2–11
Asparagină	—	—	—	—	—	—
Citrulină	—	—	—	—	—	—
Cistină	—	—	—	—	—	—
Cistină + cisteină	—	<4	14	3–33	6	0–13
Glutamină	—	—	—	—	—	—
Glutamină + asparagină	25	2–60	73	42–103	62	43–88
Acid glutamic	—	—	—	—	—	—
Glicocol	28	11–42	104	53–189	142	67–312
Histidină	47	15–83	138	20–213	128	79–208
Homocitrulină	10	1–65	—	urme	—	urme
Hidroxiprolina	—	0,8–1,4	—	<0,5	—	<0,5
Izoleucina	—	<4	15	8–24	10	5–20
Leucina	—	<4	11	6–20	9	2–16
Lizina	10	1,5–20	7	0–14	8	0–16
Metionina	—	<5	7	5–11	5	3–12
1-metilhistidina	9	0–43	73	22–114	65	26–155
3-metilhistidina	—	<5	65	35–87	48	30–69
Ornitina	—	<4	1	0–4	2	0–11
Fenilalanina	—	<5	13	8–15	13	6–41
Prolina	0,3	—	—	—	—	—
Serina	10	7–13	42	27–65	37	22–61
Taurina	7	2–14	123	44–231	87	27–161
Treonina	6	3–9	17	2–35	23	5–33
Triptofanul	—	—	21	10–32	16	5–27
Tirozina	—	<5	19	7–27	15	9–26
Valina	0,3	—	10	4–17	6	0–30

(După tabele Geigy, reproduse de Gerhard Müller).

Influenţa alimentaţiei asupra aminoaciduriei este fragmentar cunoscută. Abundenţa proteinelor alimentare determină creşteri urinare ale eliminării histidinei, treoninei, lizinei şi tirozinei. În stări de denutriţie cresc în urină concentraţiile taurinei şi acidului β-aminoizoburitic (BAIBA). Se cunosc şi variaţii de excreţie ale acestui ultim aminoacid, provocate prin iradiere sau ca efect al dereglării controlului genetic (sugerate de Harris şi contestate de alţi autori). Existenţa acidului β-aminoizobutiric, provenit dominant din timină şi mai puţin din valină, este semnalată prin prezenţa aşa-numitului spot „T" în cromatograma urinară. După Harris 10% din subiecţii ce aparţin populaţiilor necolorate, sînt purtători ai spotului „T".

Metodica de studiu şi cercetare, cît şi cea aplicată în practica de chimie clinică — în special în pediatrie — se bazează pe cromatografie în strat subţire (plăci cu celuloză, sau folii de aluminiu) sau cromatografie pe hîrtie, variantă verticală — ascendentă, descendentă, bidimensională sau circulară.

Scanned with OKEN Scanner

Ca variaţii patologice avînd drept criteriu de clasificare mecanismul fiziopatologic, independent de cauză — aminoaciduriile crescute se pot grupa în: a) *aminoacidurii renale*, prin tulburare de reabsorbţie tubulară, cu nivel sanguin normal; b) *aminoacidurii prerenale* (de revărsare) cu nivel de concentraţie sanguină şi eliminate urinare crescute. În funcţie de cauză, aceste tipuri de tulburări pot fi înnăscute sau dobîndite. Se cunosc aminoacidurii globale sau izolate privind un aminoacid sau grupuri de aminoacizi. Problema erorilor înnăscute ale metabolismului aminoacizilor se pune totdeauna la copiii ce prezintă întîrzieri în dezvoltarea corporală şi mintală. În aminoaciduriile globale, tulburarea este de multe ori asociată cu defecte de resorbţie şi a altor componente. Ca prototip al acestor sindroame poate fi luat sindromul Toni-Debré-Fanconi. Se cunoaşte şi în forma congenitală idiopatică, ce poate îmbrăca tipul sindromului Lowe, cu cataractă congenitală.

Acest diabet glucozo-fosfato-aminat este caracterizat printr-un tablou umoral exprimat de: hiperaminoacidurie masivă şi globală, glucozurie constantă, hiperfosfaturie majoră (clearence fosfatic ridicat), proteinurie redusă dar aproape constantă: în sînge, glicemie normală, fosforemie scăzută, fosfataza alcalină crescută, aminoacidemie normală, acidoză metabolică. Sindromul poate să apară şi ca manifestare secundară, în cadrul altor sindroame congenitale, cu tulburare extrarenală a metabolismului ca: cistinoza sau tezaurismoza cistinică, boala Wilson (degenerescenţa hepato-lenticulară), galactozemia, intoleranţa ereditară la fructoză, diferite glicogenoze.

În patologia dobîndită se cunosc forme benigne şi reversibile ale sindromului Toni-Debré-Fanconi, ce pot să apară în nefroze, hipersensibilitatea la vitamina D sau în intoxicaţii cu metale grele (Pb, Cd). Tulburările înnăcute ale metabolismului acizilor aminaţi sînt redate în capitolul XI.

9.2.6. ACIZII ORGANICI

În urină se elimină şi compuşi organici neazotaţi ca numeroşi acizi organici alifatici, ce se găsesc însă în concentraţii mici. Aceştia pot fi acizi graşi cu greutate moleculară mică — acid formic, acetic, butiric — diacizi ca acizii: oxalic, succinic, glutaric şi adipic. De asemenea sînt eliminaţi şi acizi-alcooli, cu important rol metabolic ca acizii: lactic, gliceric, malic, citric. Proveniența acidului oxalic — cu importanţă în patologia renală — este încă discutată. Unele ipoteze îi atribuie ca sursă oxidarea zaharurilor şi acidul ascorbic. Experienţe cu glicocol marcat au demonstrat că acest aminoacid este principalul precursor al acidului oxalic.

Acidul oxalic este prezent în urina normală în cantităţi de ordinul mg. Se găseşte în special, ca oxalat de Ca care la pH-ul slab acid al urinei precipită în forme caracteristice ce apar la microscop ca „plic de scrisoare“ (de cele mai multe ori). Cantitatea de acid uric urinar poate să crească sub influenţa alimentaţiei sau a unor tulburări metabolice. În patologia clinică se cunosc asociaţiile dintre diateza oxalică şi cea urică. Ambele conduc la depunerea de calculi, cu predominanţă oxalică sau uratică, rareori pur oxalici sau uratici. Calculii oxalici sînt alcătuiţi din cristale aciculare care fac ca litiaza oxalică să fie foarte dureroasă (eliminarea calculului). Sărurile de Mg şi fosfatul disodic favorizează solubilizarea oxalatului de Ca. Acest fapt are unele aplicaţii terapeutice.

Scanned with OKEN Scanner

În alimentaţia subiecţilor cu diateză oxalică este recomandabil să se reducă alimentele ce pot constitui o sursă de acid oxalic: măcriş, spanac, ceai, cafea, fasole verde.

Dintre α-cetoacizii eliminaţi în urină, doi sînt investigaţi în chimia clinică: acidul piruvic şi acidul α-cetoglutaric, acesta din urmă fiind în concentraţie mai mare decît primul. Aceşti acizi pot fi dozaţi în chimia clinică colorimetric, pe baza reacţiei cu 2-4-dinitrofenilhidrazină, cu formarea hidrazonelor respective în mediu alcalin. Acestea se separă cromatografic (de ex. pe hîrtie) iar eluatele spoturilor se colorimetrează.

Acizii aromatici şi heterociclici se găsesc în urină ca urmare a proceselor de detoxifiere prin conjugare la nivelul ficatului şi rinichiului (cap. XVI, XVII). Dintre toţi acizii organici ce se elimină în urină, o menţiune specială — legată de rolul lor în patologie — trebuie făcută pentru acidul oxalic şi pentru α-cetoacizi.

Acidul glucuronic apare în urină conjugat cu substanţe, în general aromatice, formate în procesul de detoxifiere (vezi cap. XVI).

Acidul hipuric, rezultat din conjugarea glicocolului cu acidul benzoic se elimină în urină în cantităţi de 0,5—0,7 g/24 ore, în funcţie de alimentaţie şi de medicaţie. În urina normală se pot găsi toţi produşii rezultaţi din procesele de detoxifiere.

10. HORMONI, VITAMINE, ENZIME

S-a izolat din urină un număr mare de hormoni şi derivaţi ai hormonilor sexuali şi corticosuprarenali, care la nivelul ficatului sau rinichiului sînt transformaţi în sulfo- sau glucurono-conjugaţi ce se elimină prin urină. Cu deosebită importanţă diagnostică pot fi menţionaţi unii hormoni şi derivaţii lor: adrenalina, noradrenalina, steroizii, gonadotropina, serotonina. Dintre derivaţii hormonali cu importanţă în patologia umană, pot fi semnalaţi următorii: acidul vanil-mandelic derivat din catecholamina (a cărei concentraţie creşte în feocromocitom), 17-cetosteroizi şi 17-hidroxicetosteroizi, derivaţi din hormonii sterozi, acidul 5-hidroxi-indol-acetic, derivat din serotonină (cu valoare diagnostică în carcinoid). Corio-gonadotropina-HCG (Human chorionic gonadotropin), este deosebit de importantă pentru diagnosticul sarcinii. Metodologia aplicată pentru dozarea acestor componente se bazează pe fluorimetrie, procede biologice, cromatografice şi radioimunologice. Se execută în laboratoare de strictă specializare. Pentru acidul vanil-mandelic, dozabil în toate laboratoarele de chimie curentă, se poate aplica metoda chimică bazată pe extracţie AVM — în solvenţi organici — urmată de oxidarea sa cu periodat de Na pentru convertirea în vanilină, ce se determină spectrofotometric la 340 nm. Acidul 5-hidroxi-indol-acetic se detectează în extractul de urină în solvenţi organici, prin reacţia de culoare cu 1-nitrozo-2-naftol şi nitrit de sodiu, a cărui intensitate poate fi măsurată la 540 nm.

Vitaminele. Unele vitamine a căror eliminare este dependentă de aportul alimentar, pot fi dozate în urină prin procedee chimice. Ele sînt: vitamina B şi vitamina C a căror concentraţie poate fi apreciată orientativ prin reacţia de culoare cu diclorfenol-indofenol. Trebuie menţionat că dozarea izolată a unei vitamine în urină nu permite concluzii judicioase asupra carenţei

Scanned with OKEN Scanner

acesteia şi a gradului atins. Sînt necesare probe de supraîncărcare pentru a se putea aprecia rezervele organismului explorat.

Enzimele. În mod normal se găsesc în urină numai acele enzime a căror greutate moleculară este mai mică de 60 000, ca de exemplu lizozimul (g. m. 11 450—14 500) şi amilaza (g. m. 45 000). Dintre acestea cea mai explorată este amilaza, cu cele două izoenzime ale sale, salivară şi pancreatică, ambele cu orientare catodală, după electroforeza în gel de agar sau în gel de amidon. Ultima are mobilitatea electroforetică mai lentă decît prima. Vizualizarea izo-enzimelor în zimogramă se realizează fie prin reacţia de culoare iod-amidon, fie prin reacţia zaharogenică, folosind reactivi enzimatici (glucozoxidază, maltază, peroxidază şi un cromogen tip ortotolidină) fie cu pastile de amidon cuplat cu un colorant, de felul pastilelor (Phadebas-Amylase-Test). Variaţii importante în patologie se întîlnesc în pancreatita acută şi în parotidita urliană (creşteri). În nefrite şi cancerul de pancreas se observă scăderi. În urină se explorează şi uropepsina, după activarea uropepsinogenului cu acid clorhidric. Muramidaza sau lizozimul a stîrnit, în ultimul timp, un interes deosebit în patologia clinică, prin variaţiile înregistrate în unele hemopatii maligne (leucoze) şi în nefropatii cronice (nefropatia endemică). Recent se explorează în urină triada enzimatică: lizozim, β-glucuronidază, alaninaminopeptidază-AAP (Haschen).

Din punct de vedere al metodicei*, toate componentele urinei normale se evaluează prin procedee aplicate şi în biochimia clinică a sîngelui (de cele mai multe ori cu diluţia prealabilă) şi prezentate principial în capitolul XIV. În cazurile speciale s-a indicat principiul metodei de investigaţie cu aplicare strict în explorările ce se execută numai în urină.

11. COMPONENTE ANORMALE ALE URINEI

Graniţa dintre constituenţii normali şi cei patologici ai urinei este destul de elastică; pentru unii dintre ei, chiar dintre cei mai importanţi în patologia renală şi cea metabolică — ca proteinele şi glucoza — diferenţa ţine de gradul de eliminare şi nu de natura substanţei.

11.1. GLUCIDELE. DIAGNOSTICUL UNEI MELITURII

În urină se găsesc mici cantităţi de diferite oze ca: glucoza (pînă la 200 mg/24 ore), fructoza, manoza (5—20 mg/l), arabinoza, xiloza (30—100 mg/l), fucoza, ramnoza, galactoza şi riboza, în urme. Prezenţa acestora conferă urinei o slabă capacitate reducătoare, detectabilă chiar în probele curente de oxido-reducere, dar mai ales prin fermentaţie sau cromatografie în strat subţire. O denumire generică dată prezenţei acestor glucide în urină este aceea de *meliturie.*

---

* Pentru a se putea trage concluzii valabile asupra componentelor urinare, în special asupra celor patologice, se recomandă să se respecte cu stricteţe regulile de prelevare şi conservare a urinei. Investigaţiile cantitative ale componentelor patologice (în special albumină şi glucoză) detectate în urină, se practică în fracţiuni de urină preluate din cantitatea colectată în 24 ore sau din emisiuni separate de la anumite intervale din zi, pentru a se stabili debitul fracţionat sau ritmul circadian al eliminării acestora. Pentru conservarea urinei — cu prevenirea contaminării cu microorganisme, ce pot altera componentele — se recomandă păstrarea la 4°C sau adăugarea anumitor substanţe ca: timol (soluţie în izopropanol), cloroform, toluol, metil 4-hidroxibenzonat, HSO_4.

Scanned with OKEN Scanner

Glucoza este glucidul cel mai important şi cel mai frecvent întîlnit în patologia clinică. Glucozuria ridicată (uneori peste 100 g/24 ore), este corelată de obicei cu hiperglicemia ca în diabetul zaharat (pancreatic). Cantitatea de glucoză din ultrafiltratul glomerular depăşeşte capacitatea de reabsorbţie tubulară. Se întîlnesc destul de numeroase cazuri de glucozurie fără hiperglicemie, determinate prin tulburarea procesului de reabsorbţie tubulară, ca în diabetul renal* sau în glicozuria din tulburările înnăscute ale aminoacizilor. Glucoza se identifică şi se dozează prin:

a) *Proba de oxido-reducere.* Cel mai frecvent acestea sînt efectuate cu reactiv cupric-alcalin, care dă naştere oxidului cupric, din care se formează oxidul cupros, galben cărămiziu. Reducerea este datorită funcţiilor aldehidă şi alcool din molecula de glucoză. Reducerea se petrece la cald.

Din această categorie fac parte reacţiile Fehling şi Benedict. Dozări orientative — bazate pe acelaşi principiu — cu aplicare în triajul analizelor de urină, cît şi în autosupravegherea bolnavului (diabeticii în special) se pot face cu tablete Clini-Test-Ames sau cu hîrtiile reactive, produse de Laboratorul Galenica OF_1 — Bucureşti. Un alt oxidant folosit în dozările de urină este $[Fe(CN)_6]K_3$ — fericianura de potasiu (metoda Ionescu-Matiu).

b) *Oxidarea enzimatică* cu glucozo-oxidază. Glucoza se transformă sub acţiunea enzimei în acid gluconic, cu producere concomitentă de H_2O_2. Peroxidaza prezentă în sistem, descompunere H_2O_2 cu oxidarea unui cromogen — tip ortotolidină (se produce culoare albastră-violet). Principiul este aplicat atît pentru dozări exacte, cît şi pentru detectări orientative, prin teste rapide, de tip Clinistix-Ames**.

Pentozele apar în urină, fie provenind din alimentaţie, fie în pentozuria esenţială, anomalie metabolică ereditară inofensivă, cu eliminare de arabinoză racemică. Se detectează prin reacţia Bial, cu orcinol.

Fructozuria se produce fie prin exces alimentar, fie ca viciu metabolic înnăscut, benign, fie ca intoleranţă la fructoză. Aceasta este un viciu metabolic, recesiv, autosomal, în care mici cantităţi de fructoză alimentară provoacă hipoglicemie şi leziuni hepatice. Se detectează prin reacţia cu rezorcină.

Lactozuria apare în cursul sarcinii, în perioada de lactaţie şi la înţărcare, în urina mamei; se poate găsi şi la sugar. Se detectează prin reacţia Wölhk adică prin culoarea roşie pe care o dă la 60°, prin încălzirea cu hidroxid de potasiu şi amoniac. Se poate caracteriza şi prin ozazona respectivă.

Galactozuria apare în aceleaşi condiţii ca şi lactozuria. Se detectează prin oxidare în acid mucic.

Acidul glucuronic. Deşi nu este un produs patologic, el apare în urină în condiţii speciale, legate de procesul de detoxifiere. Se detectează prin încălzire cu naftorezorcină, în mediu acid (HCl), cu apariţia unui compus de culoare albastră. Detalii tehnice privitoare la reacţiile de detectare menţionate se pot găsi în „Metode de laborator de uz curent" vol. II, Ed. Medicală, Bucureşti, 1977.

---

* Experimental, se obţine glicozurie fără hiperglicemie prin administrare de florizină care coboară pragul renal al glucozei.

** Primele teste româneşti de acest tip au fost elaborate la nivel artizanal de Institutul Dr. I. Cantacuzino: Enzicrom, Diabren 4 Test. Se mai pot aplica pentru diagnostic diferenţial al melituriei probele de fermentaţie, polarimetria şi producerea de ozazone.

Scanned with OKEN Scanner

11.2. PROTEINELE

Proteinuria fiziologică. După unii autori, ea este cuprinsă între 30—90 mg/24 ore, limitele fiind şi mai largi. După alţi autori, proteinuria fiziologică ar fi cuprinsă între 24—133 mg. Termenul mai vechi — impropriu — dar încă folosit în practică pentru a se indica prezenţa proteinelor în urină — este acela de „albuminurie". Proteinuria este caracterizată, în general, prin prezenţa în urină a proteinelor identice cu cele din plasmă. S-au separat electroforetic şi imunoelectroforetic: prealbumină, albumină, orozomucoid, α-1-antitripsina, α-1-lipoproteina, α-2-G_c-globulina, transferina, hemopepsina, al patrulea component al complementului, γ-A şi γ-G-globuline.

Proteinuria patologică renală. Se cunosc două tipuri principale:

11.2.1. PROTEINURIA DE TIP TUBULAR

Se întîlneşte în nefropatiile cu atingere tubulară sau interstiţială. În aceste cazuri, urina conţine proteine plasmatice şi proteine provenite din secreţia sau denaturarea proteinelor la nivelul tubilor renali. Aceste proteine au o greutate moleculară mică. Imaginile electroforetice (pe hîrtie şi mai ales în gel de amidon) sînt caracteristice. Albumina este în cantitate mică, raportul A/G (albumine/globuline) este mai mic de 0,5. Globulinele α_1 şi α_2 sînt preponderente, cu banda α_1 etalată: cîteodată se întîlnesc două fracţiuni α_2 globuline. Se pot întîlni însă şi două fracţiuni β, precum şi o fracţiune post-γ. În gel de amidon apare net o fracţiune prealbumină.

11.2.2. PROTEINURIILE SELECTIVE ŞI NESELECTIVE

Corespund, în majoritatea cazurilor, nefropatiilor glomerulare şi sînt caracterizate prin prezenţa exclusivă a proteinelor plasmatice.

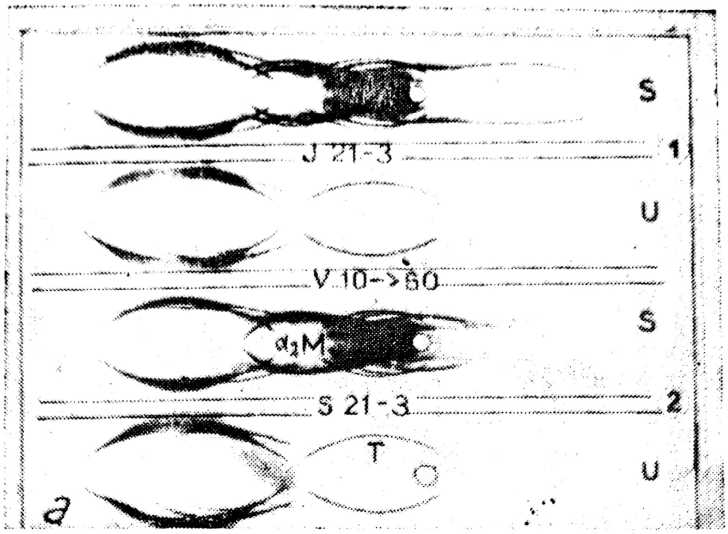
Proteinuria selectivă comportă prezenţa în urină a proteinelor plasmatice, cu greutate moleculară mai mică de 90 000 (albumină, siderofilină, α-1-glicoproteină). Albumina reprezintă mai bine de 80% din proteinele urinare (fig. XIX.12 a).

Proteinuria neselectivă cuprinde toate proteinele plasmatice, chiar cele cu greutate moleculară ridicată. Aspectul electroforetic şi imunelectroforetic al proteinelor urinare, în această situaţie, este foarte apropiat de cel al proteinelor serice (fig. XIX.12 b).

11.2.3. PARAPROTEINURIE

În situaţii speciale — sindroame proliferative ale sistemului imun (vezi Cap. XXI) —, apar în urină paraproteine. Ele sînt globuline, aparţinînd sistemului de imunglobuline, formate fie din lanţuri uşoare (kapa şi lambda) izolate (proteine Bence-Jones), fie din lanţuri polipeptidice complete, aparţinînd familiilor IgG, IgA, în mielomul multiplu sau grupul IgM în boala Waldenström. Nu se ştie dacă paraproteinele sînt globuline cu structură anormală, sau dacă ele reprezintă o populaţie moleculară restrînsă de imunoglobuline normale, produse în cantitate mare. În opoziţie cu imunoglobulinele normale caracterizate prin heterogenitate, paraproteinele sînt omogene, caracteri-

Scanned with OKEN Scanner



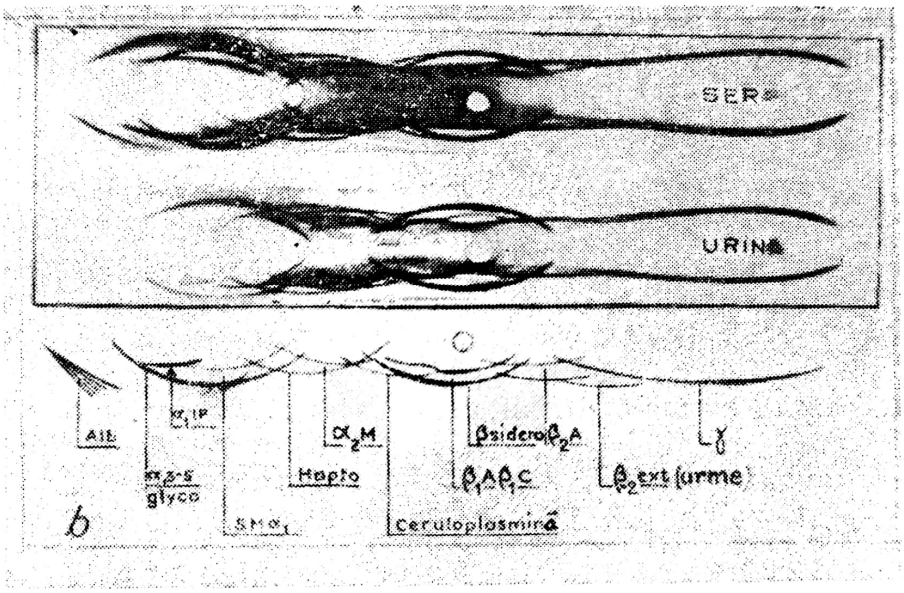


Fig. XIX.12. Proteinurie selectivă (a) şi neselectivă (b) — (fotografie).

zate prin prezenţa unui singur tip antigenic de lanţuri uşoare şi printr-o specificitate antigenică individuală.

Proteinele Bence-Jones se caracterizează prin termosolubilitate (precipită la 55—70°, se redizolvă între 80—100°; reprecipită prin răcire). Imaginea imunoelectroforetică este redată în fig. XIX. 13 — (foto).

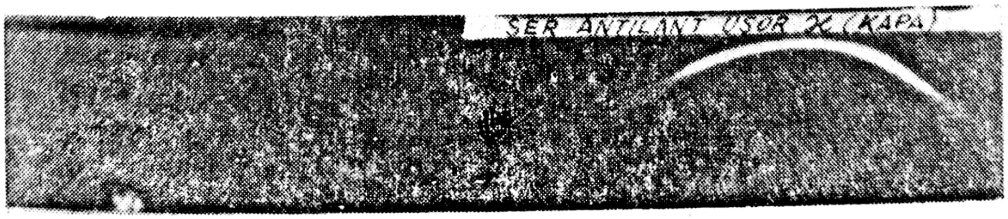


Fig. XIX.13. Imagine imunoelectroforetică de proteinurie Bence-Jones cu lanţ κ (fotografie).

Proteinele urinare se explorează prin: a) mijloace de detectare, la rece, cu acid sulfosalicilic, cu acid azotic-azotos (Heller) sau prin fierbere şi acidulare. În laboratoarele de chimie clinică modernă se utilizează aşa-numitele „teste rapide" de tip albustix (Ames), printre care se pot menţiona şi cele produse de Laboratorul Galenic OF_1 Bucureşti. Stixurile reactive au un capăt impregnat cu albastru de tetrabrom-fenol şi un tampon acid. Înainte de folosirea stixurilor urina se acidulează, dacă pH-ul său intră în zona alcalină.

b) *Ca mijloace de dozare* se folosesc procedee orientative — metoda diluţiilor — Heller, metoda Esbach (cu reactivi acid picric — acid citric); ca mijloc de dozare exactă se foloseşte metoda biuretului, aplicată direct în urină sau pe precipitatul obţinut cu acid percloric 70%, din urinele ce conţin cantităţi mici de proteine.

c) *Ca mijloace de studiu* (calitativ şi cantitativ) se folosesc procedee electroforetice, imunoelectroforetice (aplicabile după concentrarea urinei la nivelul de 3—4 g%), procedee imunochimice cu seruri monospecifice incluse în geloză (procedeul Mancini). Se aplică şi cromatografia pe coloane de schimbători de ioni (DEAE celuloză), sau filtrare în gel de Sephadex 200, pentru separarea fracţiunilor proteice, în funcţie de greutatea lor moleculară. Limitele patologice ale proteinelor sînt foarte largi, de la 150 mg pînă la cîteva zeci de grame (în nefroze) pentru un litru de urină.

11.3. ENZIMELE

Cele cu greutate moleculară mai mare de 60 000 daltoni (LHD şi izoenzimele sale, fosfataza alcalină, GPT, GOT, aldolaza) se elimină prin urină numai în condiţii patologice. Unora dintre acestea li s-a atribuit o valoare diagnostică în neoplazii ca de ex. LDH_3 şi β-glucuronidaza. Rezultatele sînt însă nesigure (Dubach). O mare dificultate a explorărilor enzimatice urinare o constituie necesitatea dializei prealabile a produsului pentru îndepărtarea numeroşilor efectori prezenţi în acest mediu biologic complex.

11.4. ELEMENTE BILIARE (PIGMENŢI ŞI ACIZI BILIARI)

11.4.1. BILIRUBINA DIRECTĂ

Se elimină prin urină, numai în icterele postmicrozomale, deoarece la nivelul acestor organite ale hepatocitului se face glucuronoconjugarea pigmentului care astfel poate fi eliminat prin rinichi. Bilirubina poate fi detectată în urină prin reacţia de oxidare în biliverdină (verde), purpurine (violet) şi colelitine (albastre). Se realizează practic prin reacţia cu iod, reacţia Popper, reacţia Rosin, reacţia cu NO_3H-G melin, cu H_2O_2-Grimbert, cu $FeCl_3$-acid tricloracetic-Fouchet, cu amestec bicromic — Ionescu-Matiu. Recent, s-a introdus pentru detectare *principiul de azocuplare* cu 2,6-diclorbenzoldiazoniu-fluoborat, în mediul acid (culoare violet). Se pot aplica teste rapide bazate pe acest principiu, ca de ex.: Ictotest (Ames), Ictostix (Ames), Bilurtest (Boehringer). Testul rapid al Laboratorului Galenic OF_1 Bucureşti se bazează pe utili-

Scanned with OKEN Scanner

zarea unor hîrtii impregnate cu clorură de bariu pe care se depune o picătură din urina de cercetat. După uscare se aplică o picătură de revelator (reactiv Fouchet, acid Tricloracetic+$FeCl_3$).

11.4.2. UROBILINOGENUL ŞI UROBILINA (BILANE ŞI BILENE)

Urobilinogenul produs prin reducerea bacteriană a bilirubinei în intestin, este parţial resorbit şi degradat în ficat, iar restul se elimină prin urină. Se detectează fie prin reacţia Ehrlich, cu paradimetilaminonbezaldehidă, în mediu acid, fie prin azo-cuplare (cu 4-metoxi-benzol-diazoniu-fluoborat) în mediu acid (culoare roşie). Se utilizează şi teste rapide (stixuri) bazate pe ambele principii de reacţie (Boehringer). Căutarea uribilinogenului se aplică împreună cu aceea a bilirubinei, pentru testarea funcţiei hepatice, în diagnosticul diferenţial al icterelor, în stările hemolitice, pentru trierea donatorilor de sînge, ca test în programele de „screening" şi de prevenire primară activă a cronicizării bolilor hepatice (pe loturi mari de populaţie). Principalele posibilităţi de reacţie sînt sintetizate în tabelul XIX. 4.

Tabelul XIX.4

Componentul urmărit	Subiect normal	Boală hemolitică	Boală hepatică	Obstrucţie biliară
Urobilinogen urinar	Normal	Crescut	Crescut	Scăzut
Bilirubina urinară	Negativ	Negativ	Pozitiv	Pozitiv

Urobilina, produs de oxidare al urobilinogenului, se explorează prin fluorescenţa verde pe care o dă complexul Zn-urobilină, în soluţie alcoolică (reactivul Schlessinger: soluţie alcoolică de sulfat de Zn). Are aceeaşi semnificaţie patologică pentru afecţiunile hepatice şi anemiile hemolitice, ca şi urobilinogenul.

11.4.3. ACIZII BILIARI

Substanţe tensioactive, se testează în urină prin procedeul Hay, cu floare de sulf: pulberea presărată la suprafaţă cade — ca o ninsoare — spre fundul paharului sau al eprubetei cu urină.

11.5. PIGMENŢII SANGUINI

Se detectează în urină fie în hematurii microscopice (prezenţă de hematii în sedimentul urinar) sau macroscopice, ce pot să apară în unele afecţiuni renale şi în general în afecţiuni urologice, fie în *hemoglobinurii* (hemoliză intravasculară fără hematii în sediment). Testarea are la bază proprietatea pseudoperoxidazică a hemoglobinei ce descompune H_2O_2 sau un peroxid organic, cu oxidarea unui cromogen, ce se colorează prompt (benzidina în reacţia Adler, culoare albastră; fenolftaleina în mediu alcalin — reacţia R. Mayer, culoare roşie; piramidonul în soluţie alcoolică, culoare violet). Testele rapide de tip occultest Ames (tablete) sau Hemastix Ames (stixuri), Reagnost-Hemo-

Scanned with OKEN Scanner

globin (tablete) — VEB Feinchemie şi altele, folosesc acelaşi principiu de reacţie. Testul pentru detectarea pigmenţilor sanguini, elaborat de Laboratorul Galenica OF_1 Bucureşti, foloseşte peroxidul de Ba şi ortotolidina (cromogen — culoare albastră).

11.6. PORFIRINELE

În urina adultului normal se elimină zilnic 50—200 μg de porfirine (coproporfirine I şi II). Creşterea acestei eliminări, cît şi apariţia — în unele forme — a uroporfirinuriei, constituie *porfiria*.

Porfiriile se împart în *secundare* (coproporfirinurie fără eliminare de uroporfirine şi porfibilinogen dar cu acid Δ-amino-levulinic crescut, ca în saturnism, de ex.) şi *porfirii esenţiale* (porfiria eritropoietică, congenitală sau boala Günther), în care urinile de culoare roşie conţin coproporfirine I — cantităţi de ordinul sutelor de mg — cu eliminare posibilă de uroporfirină III şi coproporfirină I. Din această categorie fac parte şi următoarele afecţiuni: porfiriile hepatice, porfiria cutaneea tarda, coproporfiria ereditară. În *porfiriile hepatice* criza de porfirie acută este însoţită de eliminare de porfobilinogen (peste 100 mg) şi de acid δ-aminolevulinic (cantităţi de ordinul zecilor de mg). Imediat după emisiune, urina conţine uroporfirină III iar după cîtva timp apare şi uroporfirina I. În plus, se observă o eliminare moderat crescută de coproporfirine cît şi prezenţa de porfirine cu 3, 5, 6, 7 grupări carboxilice. În *porfiria cutaneea tarda* se produce o creştere a uroporfirinelor, uneori cu preponderenţa celor de tip I, precum şi a coproporfirinelor, porfobilinogenul rămînînd în limite normale. În *porfiria mixtă* sau *„variegata“* tulburarea de eliminare a coproporfirinelor este mai evidentă în fecale, deşi în cursul sindromului acut se observă o creştere accentuată a porfobilinogenului şi a uroporfirinelor. Se cunoaşte şi o *porfirie ereditară*, caracterizată prin eliminări crescute de coproporfirine în urină şi fecale.

Porfirinele se detectează în urină prin fluorescenţa roşie pe care o prezintă în U.V. Coproporfirinele pot fi separate de uroporfirine, pe baza solubilităţii lor în eter, în mediu acid. Uroporfirinele solubile în eter, se extrag în faza apoasă, printr-un amestec acid acetic acetat de etil. Separarea lor se poate face şi electroforetic (pe hîrtie, la pH 8,6), deoarece uroporfirinele ce conţin 8 grupări COOH în moleculă, migrează către anod mai mult decît coproporfirinele ce conţin numai 4 grupări COOH.

Separarea izomerilor coproporfirinelor I şi III şi a uroporfirinelor I şi III se face prin procedee cromatografice de partiţie.

Dozările de copro- şi uroporfirine se fac fluorimetric sau spectrofotometric la 400—410 nm.

Porfobilinogenul se detectează în urină prin culoarea roşie pe care o dă cu reactivul benzaldehidic Ehrlich, compusul de culoare roşie rezultat nefiind extractibil în cloroform, spre deosebire de cel dat de urobilinogen.

Acidul delta-aminolevulinic se poate determina în urină, fie după o separare pe schimbători de ioni, fie după condensarea sa la cald cu ester etil-acetic la pH 4,6, cu formarea unui complex pirolic. Acesta se extrage în acetat de etil şi se transformă într-un complex roşu cu 4-dimetil-aminobenzen-aldehidă colorimetrabil la 560 nm.

Scanned with OKEN Scanner

11.7. CORPII CETONICI

După cum s-a menţionat în Cap. X, corpii cetonici sînt următorii compuşi: acid acetilacetic — prezent în urina normală în cantităţi de ordinul cîtorva mg — acidul β-hidroxibutiric (cîteva centigrame/l şi în urina normală) şi acetonă. Cei doi acizi se elimină prin urină în cantităţi mari, în stări de acidoză. Acetona se formează prin decarboxilarea acidului acetil acetic.

Excreţia urinară a corpilor cetonici creşte în diabet şi în general, în tulburările metabolismului glucidic, în stări de hiperactivare a metabolismului lipidic, în inaniţie, după anumite anestezii, în anumite varietăţi de acidoză şi în sarcină. În urină se practică următoarele două reacţii: una pentru detectarea acetonei — de altfel singura practicată în mod curent, iar cealaltă pentru acidul acetil acetic. Pentru acetonă se aplică variante ale reacţiei cu nitroprusiat de sodiu în mediu alcalin, cu producerea unui compus de culoare violet. Se cunosc şi se aplică următoarele variante: R. Legal (cu nitroprusiat de sodiu şi amoniac), reacţia Rothera (cu sulfat de amoniu şi nitroprusiat de sodiu). Acidul acetil acetic reacţionează intens la aplicarea acestor metode. Pentru acidul acetil acetic se practică reacţia Gerhardt cu perclorură, ferică prin care se obţine o culoare roşie-bordo, ce dispare prin încălzire. În chimia clinică actuală se aplică teste rapide — comprimate, stixuri sau pulberi reactive —, ce au la bază reacţia acetonei cu nitroprusiatul de sodiu (Laboratorul Galenic OF_1).

11.8. ACIDUL FENILPIRUVIC

Prezent în urină în oligofrenia fenil-piruvică, se pune în evidenţă prin reacţia de culoare — verde — pe care o dă cu clorura ferică (reacţia Fölling). Reacţia poate fi tulburată de bilirubină, derivaţii de imidazol, acidul vanilmandelic, acidul 5-hidroxindolacetic şi unele medicamente.

11.9. ALCAPTONURIA

Constă în eliminarea de acid homogentizic (2, 5-dihidroxifenilacetic) însoţită de excreţie crescută de fenilalanină şi de tirozină în urină. Urina este întunecată la culoare de la emisiune — brună sau chiar neagră — sau devine astfel după şedere în contact cu aerul, sau prin alcalinizare.

11.10. MELANINELE

Se elimină în urină în stadii avansate ale melanocitoblastomului. Melanogenele indolice urinare dau cu nitroprusiatul de sodiu, în soluţie alcalină, culoare roşie, ce trece în albastră cu acid acetic (reacţia Thornmählen).

12. SEDIMENTUL URINAR

Se obţine prin centrifugarea urinei proaspete la o turaţie mică (pînă la maximum 1 000 ture). Este format din *elemente organizate* şi *neorganizate*.

Scanned with OKEN Scanner

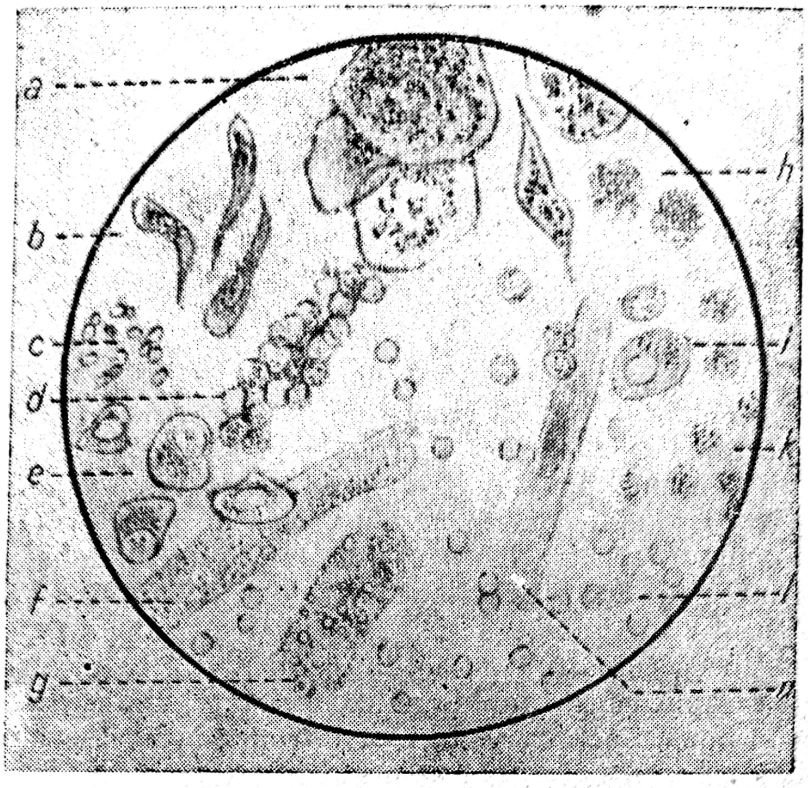


Fig. XIX.14. Sediment urinar organizat (vedere de ansamblu).
a) celule epiteliale plate; b) celule epiteliale în racheță; c) levuri; d) cilindru leucocitar; e) celule epiteliale renale; f) cilindru granulos; g) cilindru grăsos; h) leucocite degenerate; i) celulă cu denerescență grasă și vacuole; k) leucocite; l) hematii; m) cilindru hialin.

12.1. ELEMENTE ORGANIZATE

Sînt reprezentate prin celule epiteliale din căile urinare, leucocite, hematii, cilindroizi, cilindrii, care provin din tubii uriniferi (hialini, granuloși, epiteliali, hematici, grăsoși, ciroși) (fig. XIX.14). În tabelul XIX.5 sînt prezentate principalele tipuri de cilindrii urinari, caracteristicile lor, precum și condițiile lor de apariție.

12.2. ELEMENTE NEORGANIZATE

De natură organică și minerală, sînt alcătuite din elemente cristaline sau depozite de săruri amorfe. Se întîlnesc: acid uric, uraţi, fosfaţi, carbonaţi, oxalaţi, cristale de cistină, leucină, tirozină, xantină și rareori colesterol. Existența corpilor birefringenți, detectați microscopic în lumină polarizată, sprijină diagnosticul de nefroză lipoidică. Pe lîngă elementele cristaline de origine metabolică se pot întîlni în urină cristale de origine medicamentoasă, ca de exemplu cele de sulfamidă (fig. XIX.15).

12.3. SEDIMENTUL URINAR CANTITATIV

Se practică după trei modalități: metoda directă Stansfeld și Webb, se practică în urina recoltată în condiții bazale, a doua emisiune de dimineață, pe nemîncate. Valorile normale: leucocite 0—20/mm^3, hematii 0—1/mm^3

Tabelul XIX.5

Principalele tipuri de cilindri urinari

Tipul de cilindru	Caracteristici	Condiţii de apariţie
Hialini (sau mucoşi)	Scurţi avînd contur puţin precis, ocazional forme gigante, translucizi. Se examinează mai bine cu diafragmare	Atingeri renale uşoare, stări febrile sau chiar în urina normală (după palparea rinichiului) sau în stări de stress
Granuloşi	Granulaţii fine sau grosolane, provenite din degenerescenţa celulară; uneori includ globule grăsoase pe lîngă granulaţiile de natură albuminoasă	Procese renale degenerative, faza terminală a bolilor renale severe
Epiteliali	Celule epiteliale aglomerate în cilindri, nuclei mari, degenerescenţă granulară sau grăsoasă a protoplasmei	Modificări patologice în tubulii distali colectori, insuficienţă tubulară acută, pielonefrite
Ciroşi	Laţi, conturaţi perfect, maţi de culoare uşor gălbuie, prezintă crestături caracteristice pe margini, rezistenţi la acizi	Glomerulonefrită severă, pielonefrită, amiloidoză
Grăsoşi	Conglomerat de picături şi granule grăsoase, frecvent se pot observa picături de grăsime care supraîncarcă cilindrii hialini sau granuloşi	Procese renale cronice sau subacute cu degenerescenţă a elementelor renale
Pseudocilindrii	Rezultă din aglomerare de săruri: uraţi, fosfaţi; se diferenţiază de cilindrii granuloşi prin solubilitatea lor în acid acetic 3% sau acizi minerali slabi. Uneori diferenţierea între cilindrii granuloşi şi pseudocilindrii este dificilă	Nu au semnificaţie patologică
Cilindroizi	Aspect de panglică cu dungi, conturul mai puţin clar, adesea unul din capete este despicat	Nu au semnificaţie patologică
Eritrocitari	Eritrocite conglomerate din care unele au pierdut pigmentul	Retenţia unui număr mare de eritrocite în tubii renali
Leucocitari	Leucocite conglomerate în cilindri, dintre care unele pot fi alterate, sau reduse la resturi nucleare	Pielonefrită

Scanned with OKEN Scanner

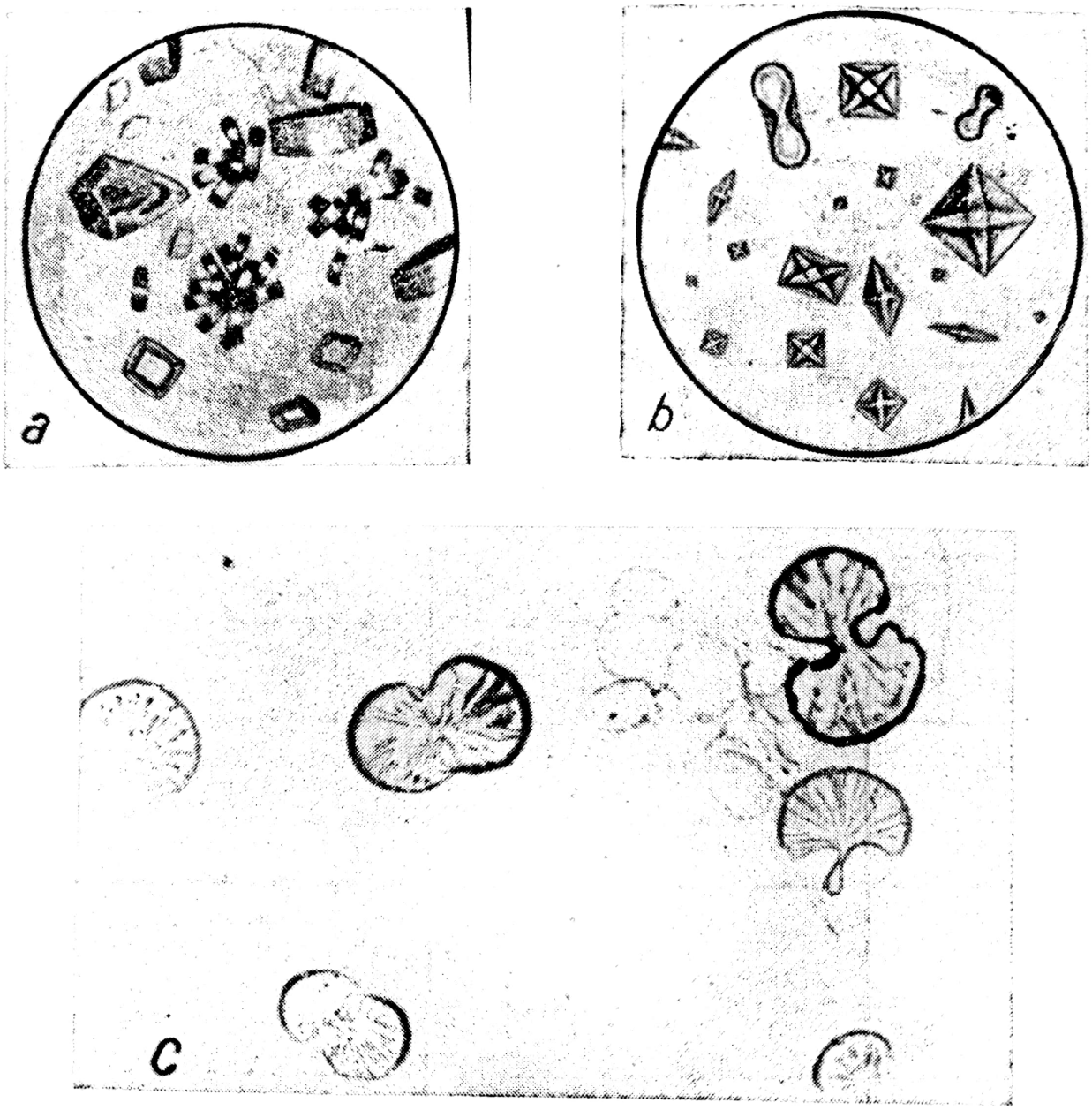


Fig. XIX.15. Exemple de sediment urinar neorganizat:
Cristale de origine metabolică: a) acid uric; b) oxalaţi; c) cristale de origine medicamentoasă (sulfonamide).

metoda Addis din urina de 12 sau 24 ore, valori normale: hematii pînă la 1 000 000/24 ore, leucocite pînă la 2 000 000/24 ore; *metoda Hamburger* cu timpul de recoltare scurtat la 3 ore, valori normale: hematii 100—1 000/minut, leucocite 2 000/minut.

13. LITIAZA RENALĂ

Producerea calculilor urinari se realizează prin micşorarea solubilităţii elementelor neorganizate ale sedimentului urinar, avînd ca rezultat aglomerarea constituenţilor în „pietre" ce se formează în tractusul urinar. Concentraţia protonilor urinari joacă un rol hotărîtor în disocierea şi solubilitatea substanţelor eliminate prin urină care cu cît sînt mai polare, cu atît sînt mai

Scanned with OKEN Scanner

hidrosolubile. Infecţiile urinare modifică echilibrul ionic, aşa încît ele pot contribui la patogeneza litiazei din tractusul urinar. Aproximativ 2/3 din totalul calculilor din nefro- sau urolitiază sînt alcătuiţi din oxalaţi de calciu. Rareori calculii sînt în formă pură, 90% dintre ei avînd mai multe componente cristaline. În ordine descrescîndă a frecvenţei calculilor în funcţie de natura lor, situaţia se prezintă astfel: oxalat de Ca şi fosfat de Ca hidroxilapatită 66%, fosfat amoniaco-magnezian (struvită) 15%, cistină şi urat 10%, apatită pură 0—1%, diferite 9%. Sînt cunoscute trei teorii asupra formării calculilor: *teoria precipitării şi cristalizării, teoria nucleaţiei matriceale şi teoria absenţei inhibitorului.*

Teoria cristalizării prin suprasaturaţie se aplică bine calculilor formaţi din cistină, acid uric, xantină, fosfat amoniaco-magnezian şi apatită. Cei mai frecvenţi calculi se produc însă la concentraţii sub limita de saturare — cei din oxalat de Ca — patogeneza formării lor neputîndu-se încadra în această teorie. Teoria nucleaţiei matriceale se referă la existenţa unui polipeptid ce se găseşte în urină şi ar servi drept nucleu de depunere a cristalelor. Nu se cunosc însă date sigure în această direcţie. Teoria *inhibitorului absent* sugerează că fenomenul de cristalizare este favorizat prin scăderea unor factori de inhibiţie printre care se numără: pirofosfatul, glucozaminglicanii (MPZ), polipeptidele mici, ureea, magneziul, citratul, aminoacizii şi oligoelementele. În calculoza oxalică se pot întîlni — destul de rar însă — hipooxalurii, aşa încît se sugerează pentru patogeneza acesteia şi alte mecanisme pe baze metabolice. De pildă, lipsa de piridoxină se poate corela cu hiperoxaluria primară. Litiaza urică se produce în hiperuricozurie. Acidul uric posedă doi protoni disociabili, dintre care numai cel din poziţia N 9 are importanţă fiziologică, deoarece al doilea se disociază numai în condiţii nefiziologice ale valorii pH-ului urinar. În urina umană valoarea pK a acidului uric este cuprinsă între 5,3—5,6. Uratul este mai solubil decît acidul uric nedisociat, aşa încît creşterea concentraţiei ionilor H^+ în urină favorizează formarea de acid uric cristalizat. Hiperaciditatea urinară favorizează însă şi depozitarea uraţilor. La pacienţii cu infecţie urinară cu microorganisme, ce posedă ureează şi generează amoniac, alcalinizarea consecutivă a urinei favorizează formarea calculilor de fosfat amoniaco-magnezian.

14. ROLUL VASOPRESOR AL RINICHIULUI

Acest organ cu important rol homeostatic îndeplineşte şi o funcţie endocrină. Cortexul renal — mai ales în stare de ischemie — secretă la nivelul celulelor justaglomerulare o enzimă proteolitică, renina, ce trece în circulaţie prin vena renală. Renina declanşează un proces în cascadă, ce se realizează în două etape (fig. XIX.16). În prima etapă acţionează specific asupra *angiotensinogenului* — denumit şi *hipertensinogen* — o alfa-2-globulină formată în ficat. Renina, ca protează rupe o legătură leucil-leucinică din angiotensiogen şi liberează astfel un decapeptid, angiotensina I, cu activitate vasomotrie slabă. Studiul secvenţei aminoacidice a acestui lanţ peptidic a arătat că există variaţii dependente de specie la aminoacidul din poziţia 5 (valină sau leucină). În etapa a doua, angiotensina I este transformată prin acţiunea unei peptidaze sau „enzima de conversiune" (localizată şi provenită din celulele endoteliale ale capilarelor pulmonare), într-un octapeptid, angiotensina II, puter-

Scanned with OKEN Scanner

nic vasopresor. Formarea octapeptidului se face prin desprinderea celor doi aminoacizi C-terminali, histidina şi leucina, ai angiotensinei I. Aceeaşi enzimă de conversie este răspunzătoare şi de degradarea bradikininei.

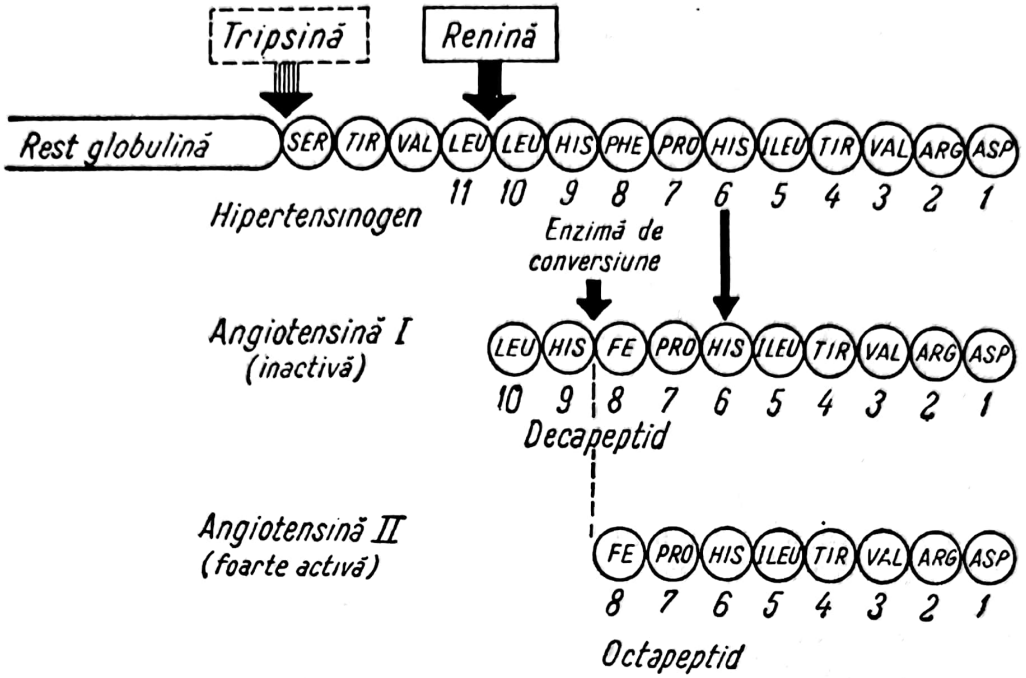


Fig. XIX.16. Sistemul renină angiotensină = procesul „în cascadă" declanşat de renină.

Cercetări recente adaugă o a treia etapă procesului în cascadă declanşat de renină şi anume: îndepărtarea restului N-terminal al angiotensinei II ce conduce la formarea unui heptapeptid, angiotensina III, ce pare să fie mediatorul biologic efectiv în secreţia aldosteronului. În prezent se studiază activ tipuri de substanţe ce pot acţiona ca antagonişti ai sistemului renin-angiotensină. Dintre acestea se pot menţiona, în special, inhibitorii enzimei care declanşează „cascada 2" a formării peptidelor active: pepstatinele (cu structură de ac. 4-amino-3-hidroxi-6-metilheptanoic). Anumite peptide ce se găsesc în veninul unor şerpi inhibă degradarea bradikininei şi totodată blochează conversia angiotensinei I în angiotensina II. Angiotensina II este unul din cele mai puternice vasopresoare, mult mai activă decît noradrenalina (după unii autori chiar de 200 ori, iar după alţii de 20 de ori). Pe lîngă efectul vasoconstrictor şi ridicarea TA, angiotensina II are şi efect miotropic, provocînd contracţia muşchilor netezi. Importanţa fiziologică a sistemului renină-angiotensină constă în corelaţia sa funcţională cu corticosuprarenala, provocînd la acest nivel o importantă creştere a secreţiei de aldosteron. Cercetări experimentale arată că injecţia de renină provoacă o hipertrofie a suprarenalelor. S-ar stabili un ciclu de reglarea TA, la care participă rinichiul şi suprarenalele prin hormonii respectivi (sistemul renină-angiotensină şi aldosteronul).

Acţiunea angiotensinei este de scurtă durată, deoarece ea este rapid degradată în oligopeptide şi aminoacizi sub acţiunea, atît a peptidazelor nespecifice, cît şi prin aceea a peptidazelor specifice, angiotensinazele, ce se găsesc în plasmă, hematii şi alte ţesuturi. Sistemul renină-angiotensină intervine direct sau prin hiperaldosteronismul pe care-l provoacă, în mecanismul

Scanned with OKEN Scanner

de ridicare a tensiunii arteriale. Este activ, mai ales în condiţii hemodinamice de diminuare a fluxului plasmatic renal, ce provoacă ischemia renală.

Prin cromatografia de afinitate (cu inhibitori sau substraturi modificate ale reninei) se obţine renină pură, ce permite obţinerea anticorpilor respectivi. Cu aceştia se realizează dozarea imuno-chimică, sau — prin marcarea anticorpilor respectivi cu radioizotopi — dozarea radioimunochimică a reninei.

15. EXPLORAREA FUNCŢIONALĂ RENALĂ

Se menţionează, fără detalii tehnice, schema de investigaţii ce rezultă logic de altfel, din natura însăşi a funcţionării renale. Acestea pot fi grupate în două categorii principale: a) *probe funcţionale globale*, ce permit aprecierea rezultantei ansamblului funcţional renal, şi b) *probe funcţionale selective* ce permit studiul separat al funcţiilor glomerulare şi tubulare.

15.1. PROBE FUNCŢIONALE GLOBALE

În urină, examenul sumar de urină, cu accent pe volumul şi densitatea urinii (din 24 ore), elemente chimice anormale — în special proteinuria, tipul şi gradul ei, sedimentul urinar, cu atenţie pentru cilindrurie — tipul, abundenţa şi dimensiunile cilindrilor — hematii, leucocite, germeni. Cînd este cazul se cere urocultura cu antibiogramă şi sedimentul urinar cantitativ.

— *Osmolaritatea* prin determinarea punctului crioscopic (delta crioscopic).

— *Determinarea electroliţilor urinari.*

— *Dozarea amoniacului* (în condiţii de conservare, ce împiedică fermentaţia amoniacală a urinei).

În sînge prin dozări de: creatinină, uree, acid uric, eventual azot total neproteic, electroliţi, rezervă alcalină.

15.2. PROBE FUNCŢIONALE SELECTIVE

— *Explorarea funcţională a glomerulului:* se determină mărimea filtratului glomerular prin stabilirea „clearence-ului" creatininei endogene, al inulinei, manitolului sau hiposulfitului de sodiu.

Prin simplitatea şi utilizarea sa clinică, clearence-ul creatininei endogene este cel mai frecvent solicitat. Valoarea sa medie normală de 125 ml/minut, pentru o suprafaţă corporală de 1,72 m^2, corespunde unui adult normal, de talie mijlocie, cu greutatea de 70 kg.

— *Fluxul plasmatic renal* cu PAH la concentraţii plasmatice joase. Fluxul plasmatic normal fiind 600 ± 200 ml/min.

— *Explorarea funcţională tubulară:*

Proba de diluţie şi concentraţie (Volhard).

Probe de bilanţ (Na, Cl).

Clearence-ul tubular al PSP (Fenolsulfonftaleină): stabilirea capacităţii maxime de excreţie a PSP.

Măsurarea capacităţii maxime a secreţiei PAH.

Măsurarea capacităţii maxime de resorbţie a glucozei (proba Govaerts).

15.3. EXPLORAREA FUNCŢIONALĂ A RINICHIULUI, SEPARAT

Se practică, în special, după caz, urografia descendentă, ascendentă nefrograma izotopică, scintigrafia renală.

Scanned with OKEN Scanner

Capitolul XX

VITAMINELE

1. INTRODUCERE

Vitaminele constituie o categorie de substanţe care — în cantităţi foarte mici — sînt indispensabile organismelor animale. Aceste substanţe nu pot fi sintetizate în organismele animalelor superioare şi, de aceea, trebuie să fie procurate de raţia lor alimentară.

În organismele animale vitaminele nu sînt materiale structurale, de felul principiilor imediate, ci îndeplinesc roluri funcţionale. Deşi pentru îndeplinirea acestor roluri organismul omului are nevoie de cantităţi foarte mici de vitamine (în genere, cîteva mg pe zi), raţia alimentară trebuie să le procure regulat. Altfel, ajung să se declanşeze anumite stări patologice specifice, numite avitaminoze. Cînd nu sînt de lungă durată, avitaminozele sînt suprimate prin administrarea de vitamine.

1.1. NOŢIUNILE DE VITAMINĂ ŞI DE AVITAMINOZĂ

Aceste noţiuni sînt relativ noi; sensul lor a fost lămurit cu cca 68 de ani în urmă. Unele avitaminoze — scorbutul, beri-beri-ul, pelagra şi rahitismul sînt însă cunoscute de foarte multă vreme (cu secole în urmă).

Natura avitaminozelor şi existenţa vitaminelor nu au fost recunoscute decît în jurul anului 1910 deoarece nu se concepea pînă atunci că ar putea să existe boli de carenţă şi nici nu se putea înţelege că, pe lîngă principiile imediate (glucide, lipide, protide) organismele mai au nevoie şi de alte substanţe considerate „factori accesorii".

În 1912, cercetătorul polonez Kazimir Funk a adus o contribuţie valoroasă pentru lămurirea factorilor accesorii susţinînd că toate bolile de tipul scorbutului, pelagrei, beri-beri-ului, rahitismului, sînt datorate lipsei din raţii a unor factori nutritivi suplimentari. Funk a propus ca acestor factori să li se spună „vitamine"; nume ce le-a rămas.

Originea şi sensul numelui de vitamină se sesizează uşor dacă se iau în consideraţie următoarele fapte: Funk izolase din tărîţa de orez un preparat cristalizat — considerat pur — şi care din punct de vedere chimic era o amină. Totodată, Funk observase că preparatul izolat din tărîţa de orez era activ în tratarea şi prevenirea unei boli a păsărilor, numită polinevrita aviară. De aceea, Funk a propus ca substanţa considerată factor accesoriu indispensabil pentru menţinerea sănătăţii păsărilor şi presupusă că are funcţie organică aminică să se numească vitamină antinevritică. Pentru ceilalţi factori

Scanned with OKEN Scanner

indispensabili prevenirii scorbutului, pelagrei, rahitismului, Funk a propus ca ei să fie numiţi, respectiv: vitamina antiscorbutică, vitamina antipelagroasă, vitamina antirahitică.

Este de reţinut că există şi vitamine distincte din punct de vedere chimic care îndeplinesc aceleaşi funcţii în organism şi a căror carenţă determină acelaşi sindrom. Acestea se numesc „vitamere". Spre exemplu, diverse vitamine antirahitice D sînt caracterizate, una în raport cu alta, drept vitamere; astfel încît, în loc de v i t a m i n e l e D se spune adesea v i t a m e r e l e D.

1.2. CLASIFICAREA VITAMINELOR

Postulată de Funk în 1912, multiplicitatea vitaminelor a fost demonstrată în anii următori. Azi se cunosc numeroase vitamine cu constituţii chimice foarte variate. Din această cauză, ele nu au putut fi clasificate conform constituţiei.

Clasificarea vitaminelor se bazează pe criterii de solubilitate. Din acest punct de vedere, se deosebesc: *vitamine liposolubile* (cele solubile în grăsimi) şi *vitamine hidrosolubile* (cele solubile în apă). Primul grup cuprinde: vitamina A, vitamina D, vitamina E şi vitamina K iar al doilea grup cuprinde: vitamina B_1 (tiamina), vitamina B_2 (riboflavina), vitamina B_6 (piridoxina), vitamina PP (niacina), biotina, acidul pantotenic, acidul folic, vitamina B_{12} (cobalamina) şi vitamina C (acidul ascorbic). Majoritatea vitaminelor hidrosolubile intră în constituţia coenzimelor. În categoria vitaminelor hidrosolubile mai sînt incluse şi alte substanţe care totuşi nu sînt recunoscute — în mod unanim — drept vitamine pentru animalele superioare.

2. VITAMINELE LIPOSOLUBILE

2.1. VITAMINA A

2.1.1. EFECTELE CARENŢEI

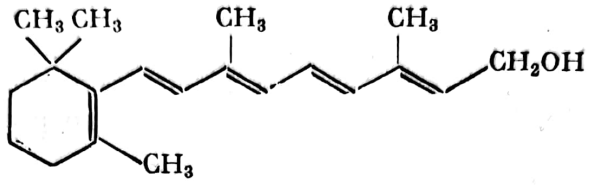
Pentru cercetarea acestei vitamine, este util să se menţioneze — în primul rînd — simptomele determinate de lipsa ei, atît la animalele cărora li s-a provocat carenţa experimentală, cît şi la om. Un prim simptom, studiat experimental la şobolan, este încetarea creşterii (fără a fi însă specific). Un alt simptom general de avitaminoză A este cheratinizarea epiteliilor; în primul rînd la nivelul epidermei şi apoi la nivelul unor mucoase: a vaginului, a uterului (colpokeratoză). Cheratinizarea produsă la nivelul conjunctivei şi corneei poate conduce la leziuni grave care să antreneze chiar pierderea vederii. Asemenea situaţii au fost numite xeroftalmie şi cheratomalacie. Xeroftalmia este cheratinizarea celulelor epiteliale din conjunctivă şi cornee, asociată cu procese infecţioase secundare; ochiul este inflamat şi purulent. Cînd afecţiunea progresează se ajunge la cheratomalacie caracterizată de subţierea corneei, opacifierea şi perforarea ei.

Un alt simptom al deficienţei de vitamină A care nu este în legătură cu cheratinizarea însă se referă tot la vedere, este hemeralopia. Aceasta constă în scăderea, eventual în dispariţia, capacităţii de a vedea cînd lumina este foarte slabă. Legătura între deficienţa de vitamină A şi hemeralopie este azi perfect cunoscută.

Scanned with OKEN Scanner

În organism, vitamina A se formează în special la nivelul mucoasei intestinale — şi în mai mică măsură în ficat, muşchi şi plămîni — prin transformarea provitaminelor A (α-, β-, γ-carotenii). Modificarea pe care o suferă provitaminele A cînd trec în vitamina A constă într-un proces de oxidare. Acesta conduce la dislocarea completă a unei jumătăţi a moleculelor provitaminelor şi la transformarea primei grupe —CH= din a doua jumătate într-o grupare alcoolică primară —CH_2OH. Se constituie astfel molecula vitaminei A.

2.1.2. STRUCTURA CHIMICĂ

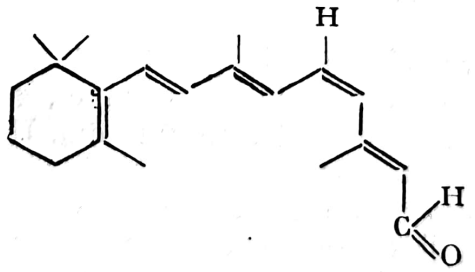


Vitamina A_1

2.1.3. MODUL DE ACŢIUNE

Pentru cercetarea rolului vitaminei A în vederea crepusculară este util să se facă şi următoarele precizări: vederea crepusculară este mediată de bastonaşele din retină iar în bastonaşe se află un pigment, „purpura vizuală", numită şi *rodopsina*. Rodopsina este o proteină conjugată (vezi Cap. III) care absoarbe radiaţii în UV (max. 350 nm) şi în vizibil (max. 500 nm). Datorită acestei ultime valori, la om, sensibilitatea maximă a bastonaşelor din retină pentru vedere este în preajma valorii de 500 nm.

Rodopsina este constituită dintr-o proteină simplă, *opsina* şi un grup prostetic, *retinen*. Acesta este de fapt aldehida corespunzătoare retinolului, vitaminei A, însă cu dubla legătură dintre C-11 şi C-12 avînd structură *cis*. Retinenului din rodopsina stabilă i se spune *neoretinenul b*; deci, rodopsina= opsină + neoretinen b:



Δ 11-cis-retinen (neoretinen b)

Senzaţia vizuală, mediată de bastonaşe, ia naştere în urma absorbţiei cuantelor de lumină de către rodopsină. Însă absorbţia de lumină determină descompunerea rodopsinei în opsină şi retinen cu structură trans (all-trans). Fotochimic, aceasta poate trece din nou în 11-cis-retinen (neoretinen b) care unindu-se cu opsina să refacă rodopsina. Refacerea rodopsinei are loc relativ încet la întuneric, în stratele profunde ale bastonaşelor (unde lumina nu pătrunde). Reacţia este catalizată de o enzimă specifică, retinen-izomeraza. Cum însă o mare parte din retinen (all-trans) este redus sub influenţa unei dehidrogenaze alcoolice (dependentă de $NADH_2$) transformîndu-se în vitamină A care trece în sînge, se înţelege că refacerea rodopsinei va depinde de

Scanned with OKEN Scanner

cantitatea de vitamină A aflată în circulaţia din organism. Într-adevăr, aşa cum reiese din schema următoare, din vitamina A (all-trans) aflată în sînge poate rezulta izomerul 11-cis-retinol şi acesta prin oxidare — pe seama aceleiaşi enzime, pendentă de $NADH_2$ — poate să treacă în 11-cis-retinen care se combină, la întuneric, cu opsina refăcînd rodopsina (fig. XX.1). Configu-

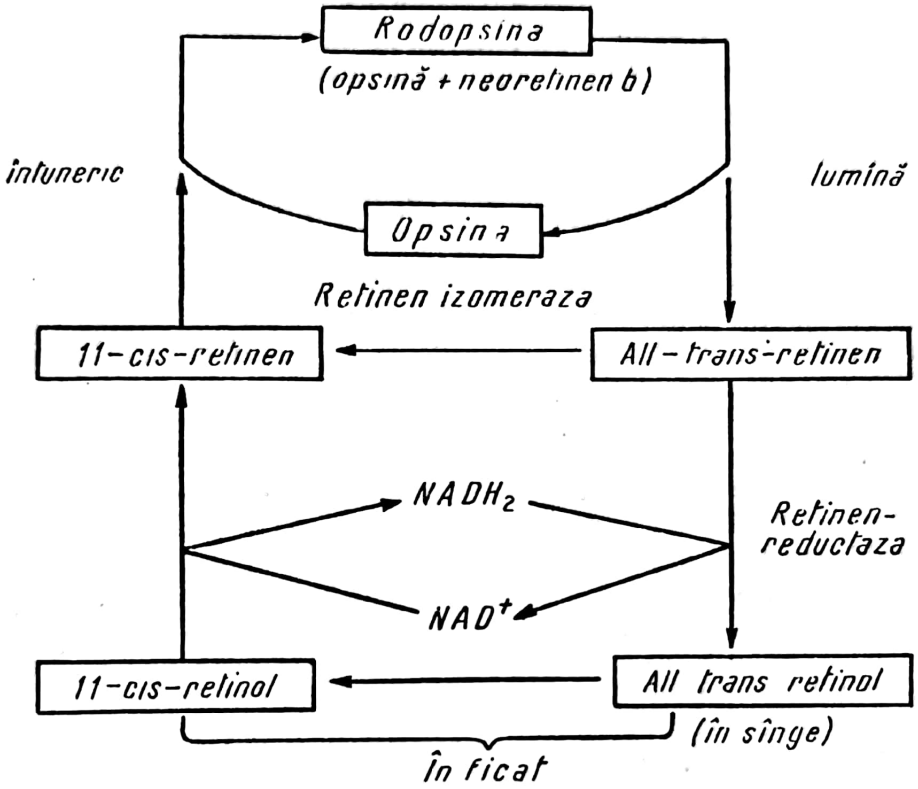
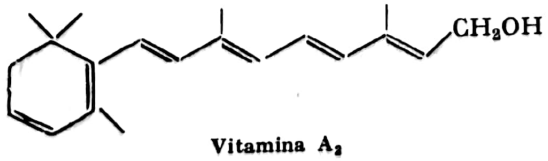


Fig. XX.*1.* Ciclul rodopsinei.

raţia formei cis a retinenului se potriveşte mai bine decît cea a formei trans cu dispoziţia spaţială şi suprafaţa exterioară a opsinei (componenta proteică a rodopsinei). De aceea, între grupul aldehidic al 11-cis-retinenului şi un grup amino liber dintr-un aminoacid diaminomonocarboxilic cuprins în opsină are loc o condensare ca cea conducînd la baze Schif: R—CH=N— opsină (în care R=radicalul 11-cis-retinen). Rezultă astfel rodopsina.

2.1.4. RĂSPÎNDIRE

Vitamina A se află în unele produse animale: untura de peşte, ficatul multor animale, gălbenuşul de ou, untul. În ficatul peştilor de apă dulce se află 3-dehidroretinolul sau vitamina A_2:



Vitamina A_2

Provitaminele A se află în produse vegetale: morcovi, spanac, varză.

2.1.5. NEVOI

Nevoia zilnică medie de vitamină A a adultului este de 1,5 mg (sau 3mg β-caroten).

2.2. VITAMINA D

2.2.1. EFECTELE CARENȚEI

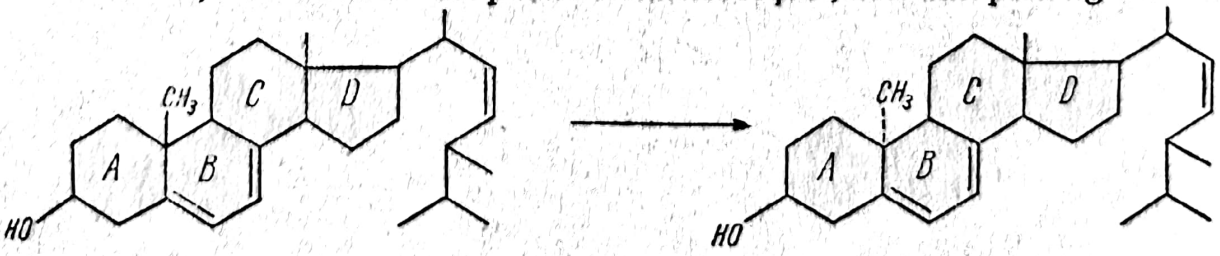
Lipsa de vitamină D la copii determină boala, altădată foarte frecventă, numită rahitism. Această boală se caracterizează printr-o mineralizare întîrziată a oaselor. În asemenea cazuri oasele nu ajung să-și însușească hidroxilapatita în cantitate suficientă și de aceea ele sînt relativ moi și flexibile. Lipsa de substanță solidă este compensată de dezvoltarea anormală a articulațiilor la nivelul cărora oasele cresc prin formare de țesut cartilaginos în cantități foarte mari. La adulți se întîlnește, de asemenea, o boală datorită carenței de vitamina D, numită osteomalacie. Ea este caracterizată de bilanț negativ al calciului (se pierde mai mult decît se ingeră) și de o demineralizare a oaselor care devin deformabile și fragile. (Starea oaselor este caracterizată prin termenul foarte sugestiv de *osteoporoză*). Datorită simptomelor foarte asemănătoare (fragilitatea oaselor), osteomalacia poate fi socotită drept un rahitism al adulților. De fapt, ambele boli se datoresc unei scăderi a conținutului scheletului în substanțe minerale.

Observarea faptului că vitamina D poate să vindece rahitismul cînd este administrată ca atare sau sub formă de untură de pește, despre care se știe azi că este bogată în vitamină D, a făcut ca această vitamină să fie considerată vitamină antirahitică. Ideea că rahitismul este o avitaminoză a fost susținută de Funk încă din 1913, însă vitamina D nu a fost izolată decît în 1931. Începînd însă din 1924 s-au constatat următoarele fapte: (1) unele alimente fără acțiune antirahitică devin apte să prevină și să vindece boala dacă sînt iradiate cu raze U.V.; (2) substanța care devine activă în urma iradierii este cuprinsă în fracțiunea sterolică a lipidelor din alimente; (3) ergosterolul ca atare — fără activitate antirahitică — devine deosebit de activ prin iradiere cu U.V. În organism, acest proces are loc la nivelul tegumentelor. Vitamina care ia naștere prin iradierea ergosterolului a fost numită vitamina D_2 (se va arăta mai departe de ce poartă indicele 2) sau calciferol, sau ergocalciferol (numele cel mai potrivit).

2.2.2. TRECEREA ERGOSTEROLULUI ÎN ERGOCALCIFEROL (VITAMINA D_2)

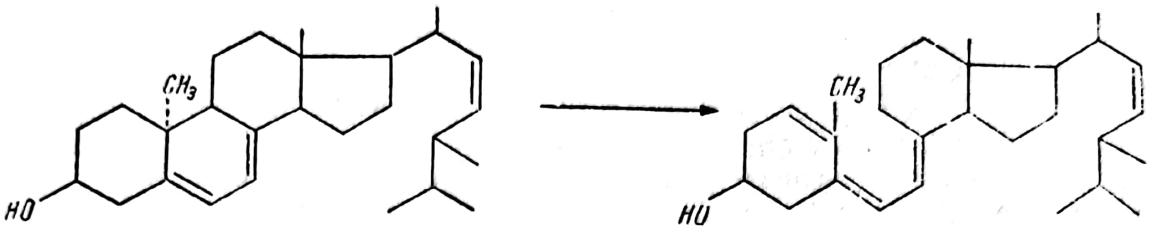
Această trecere are loc, conform unuia din mecanismele cunoscute, astfel:

a) Într-o primă etapă, ergosterolul la care gruparea metil din poziția 10 se află în fața ciclurilor A și B, deci unit prin legătură β, trece în lumisterol la care același metil se află în spatele ciclurilor A și B, deci unit prin legătură α:



Ergosterol *Lumisterol*

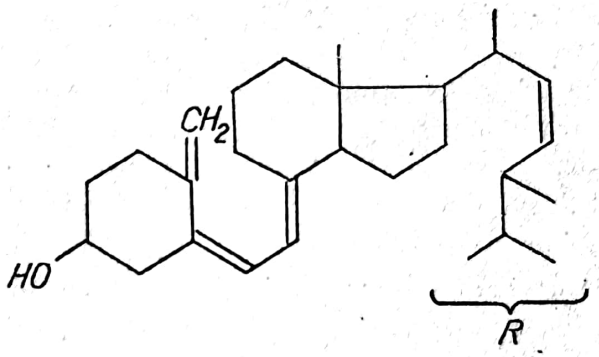
b) În etapa a doua se rupe legătura dintre C_9 și C_{10} din ciclul B, stabilindu-se o dublă legătură între C_1 și C_{10}. Substanța rezultată se numește tahisterol (deși nu mai este sterol).



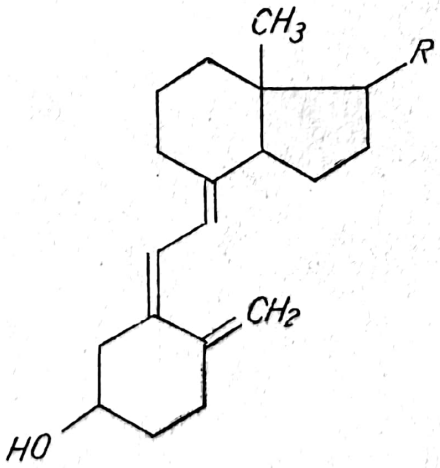
Lumisterol *Tahisterol*

Tahisterolului i se mai dau însă și alte formulări.

c) În etapa următoare are loc o rearanjare a dublelor legături care ajung să formeze un sistem conjugat cu trei duble legături între atomi: $C_{19}—C_{10}$, $C_5—C_6$ și $C_7—C_8$. În urma acestei reangajări tahisterolul trece în ergocalciferol:



În raport cu legăturile duble de la C_5 și C_7, ergocalciferolul este un izomer *cis*; el se poate afla însă și într-o conformație alungită:



Se observă că forma alungită prezintă o altă orientare a liganzilor față de legătura $C_6—C_7$. Aceasta este conformația pe care o ia vitamina cînd se află în stare cristalină; în soluție se găsesc însă — în echilibru — ambele forme.

Scanned with OKEN Scanner

Unii autori consideră că trecerea ergosterolului în ergocalciferol nu are loc aşa cum s-a arătat, ci printr-un intermediar numit precalciferol iar lumisterolul şi tahisterolul sînt derivaţi secundari şi nu intermediari.

Din formulele prezentate anterior se constată că ergocalciferolul este un izomer al ergosterolului, însă vitamina nu este steroid căci nu cuprinde nucleul tetraciclic al steranului.

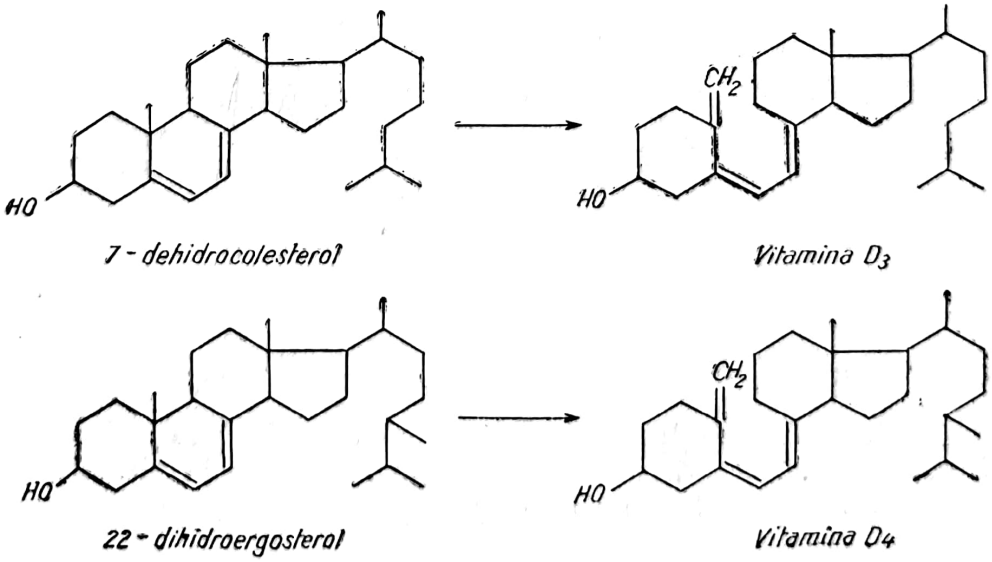
De ce i s-a spus ergocalciferolului vitamina D_2? Primul produs activ obţinut prin iradierea ergosterolului, deşi era un amestec de lumisterol şi ergocalciferol, a fost considerat ca o substanţă pură şi s-a numit *vitamina D*. Ulterior, cînd s-a izolat ergocalciferolul pur — diferit de vitamina D iniţială — s-a numit amestecul lumisterol + ergocalciferol, vitamina D_1 iar ergocalciferolul pur, vitamina D_2.

2.2.3. STRUCTURI CHIMICE ŞI PROPRIETĂŢI

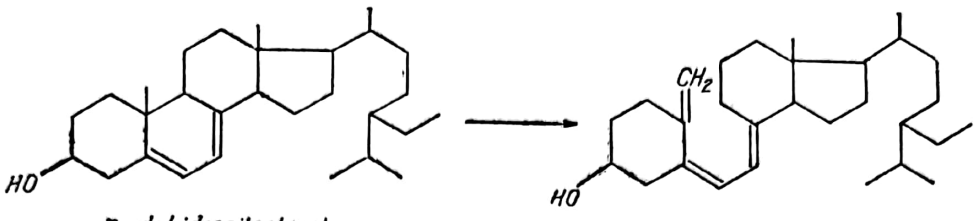
Vitamina D_2 (ergocalciferolul) este o substanţă solidă, incoloră, cristalină, cu p. t. cca 116°; este solubilă în grăsimi şi solvenţi organici. Vitamina D_2 este relativ stabilă în aer şi la încălzire; este stabilă şi faţă de acizi.

Alte vitamine D. Diverse şi multiple cercetări au dus la descoperirea prezenţei în anumite alimente a unui derivat al colesterolului, 7-dehidrocolesterolul. Acesta, prin iradiere cu raze U.V., dă naştere la o altă substanţă cu acţiune antirahitică, numită vitamina D_3 sau colecalciferolul. Transformarea fotochimică a 7-dehidrocolesterolului în colecalciferol se pare că are loc la fel (prin etape similare) cu transformarea ergosterolului în vitamina D_2.

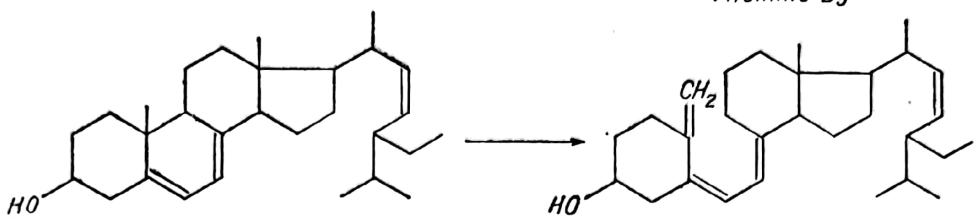
Diverse cercetări au dovedit că în afară de provitaminele D menţionate (ergosterol şi 7-dehidrocolesterol) mai există şi alţi steroli care prin iradiere cu raze U.V. se transformă în vitamine D. Astfel, 22-*dihidroergosterolul* dă naştere prin iradiere la vitamina D_4, 7-*dehidrositosterolul* formează prin iradiere *vitamina* D_5, 7-dehidrostigmasterolul dă naştere prin iradiere la *vitamina* D_6:



Scanned with OKEN Scanner



7- dehidrositosterol — Vitamina D_5



7- dehidrostigmasterol — Vitamina D_6

Unele vitamine D sînt fără importanţă practică; singurele care prezintă interes (în nutriţie şi în terapeutică) sînt vitamina D_2 şi vitamina D_3.

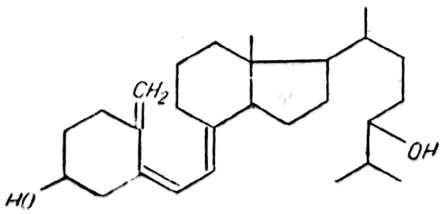
Activitatea tuturor vitaminelor D este legată de prezenţa în molecule a ciclurilor A, C şi D, a sistemului de 3 duble legături conjugate, a grupului OH din poziţia 3 şi a metilului din poziţia 13.

2.2.4. MODUL DE ACŢIUNE

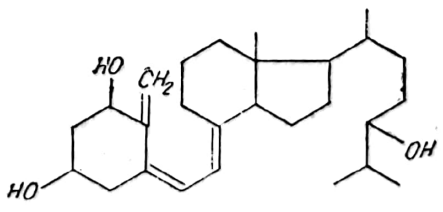
Prin administrare de vitamină D la rahitici se normalizează mineralizarea cartilajelor epifizare, aflate în plină proliferare. Această restaurare a calcifierii este în legătură cu două efecte de ordin biochimic pe care le determină administrarea de vitamină D: creşterea absorbţiei intestinale de calciu (care la rahitici este mult scăzută) şi normalizarea concentraţiei fosforului din plasmă (care la rahitici este de asemenea, mult scăzută). Creşterea concentraţiei fosforului din plasmă sub acţiunea vitaminei D nu se datoreşte unei absorbţii mai mari, ci scăderii excreţiei.

Alterarea raportului Ca/P la rahitici, prin scăderea concentraţiei fosforului, se manifestă şi la nivelul dinţilor, încetinindu-se formarea dentinei. Prin administrarea de vitamină D procesul se normalizează. S-a observat însă că dacă vitamina D se administrează în exces se produc de asemenea tulburări la nivelul dinţilor. Ele sînt caracterizate prin calcifieri anormale (în regiuni în care nu ar trebui să aibă loc).

Este de remarcat că vitamina D participă la procesele metabolice menţionate sub două forme active, obţinute prin hidroxilarea sa suplimentară în poziţiile 25 şi 1:



25-hidroxicolecalciferol



1,25-dihidroxicolecalciferol

Formarea acestor compuşi are loc în ficat şi rinichi, aşa cum reiese din schema prezentată în fig. XX.2.

2.2.5. RĂSPÎNDIRE

Alimente bogate în vitamina D sînt: ficatul, laptele, untul, smîntîna, gălbenuşul de ou, peştii de mare (ţesutul lor muscular).

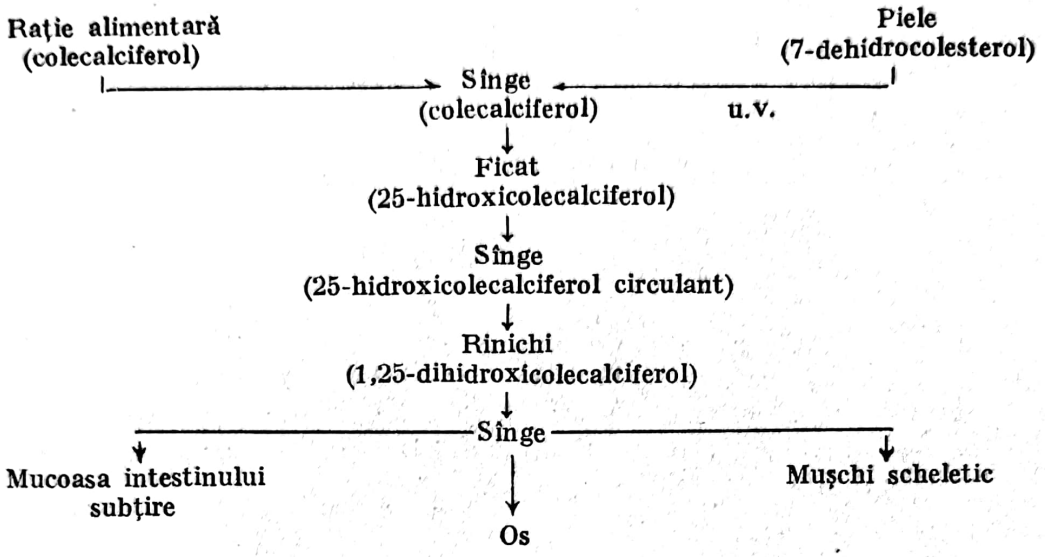


Fig. XX.2. Circulaţia vitaminei D în organism.

2.2.6. NEVOI

În genere, pentru adulţi, nevoile de vitamină D_2 sînt împlinite de raţiile alimentare iar prin expunerea la soare a pielii, în straturile ei superficiale, 7-dehidrocolesterolul (intermediar în biosinteza colesterolului avînd loc în organism) este transformat — sub acţiunea razelor U.V. — în vitamină D_3. În schimb, nevoile copiilor nu ajung să fie împlinite în acest fel şi vitamina trebuie să fie procurată de raţia alimentară. Se admite că raţia trebuie să procure minimum 2 μg vitamină D/zi; aportul optim este de 10 μg/zi. Pentru femeile însărcinate şi cele care alăptează raţiile trebuie să cuprindă 10—20 μg vitamina D/zi.

2.3. VITAMINA E

2.3.1. EFECTELE CARENŢEI

S-a provocat experimental la şobolani carenţa de vitamină E şi s-au studiat efectele ei, atît la femele cît şi la masculi. La femele s-a constatat că în a 12-a sau în a 13-a zi de la concepţie, intervin tulburări grave în alimentarea cu sînge a fetusului, aşa încît el moare şi este resorbit. La masculi s-au observat altfel de tulburări: degenerescenţa epiteliului germinal din testicule şi atrofia ţesutului spermatogenic, conducînd la încetarea spermatogenezei.

La puii născuţi din femele carenţate se constată o distrofie musculară gravă. Aceasta se instalează eventual şi la adulţi în cazul lipsei de vitamină din raţii.

Scanned with OKEN Scanner

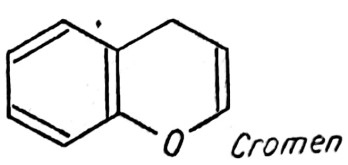
La om — şi în genere la animalele care se hrănesc în condiţii normale — nu se cunosc tulburări datorită carenţei de vitamină E. Totuşi, se consideră că diverse forme de distrofii musculare, tulburări ale fertilităţii şi alte sindroame întîlnite la om, pot fi determinate de lipsa vitaminei E.

Din cele menţionate, rezultă că vitamina E este — în primul rînd — vitamina fertilităţii (vitamina care previne sterilitatea).

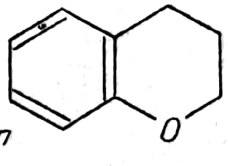
Din diverse produse naturale s-a extras un preparat cristalin, foarte activ, considerat drept vitamina E şi care s-a numit tocoferol („tokos", în greceşte, a naşte). Ulterior, s-a dovedit că preparatul nu era o singură substanţă ci un amestec de mai mulţi compuşi asemănători din punct de vedere chimic şi cu activităţi deosebite. Aceşti vitameri au fost numiţi tocoferoli. Se cunosc şase asemenea tocoferoli dar mai activi sînt numai cei trei pentru care se dau formulele mai departe.

2.3.2. STRUCTURA CHIMICĂ ŞI PROPRIETĂŢI

Tocoferolii cuprind în moleculele lor nucleul cromanului, produs de hidrogenare a heterociclului fundamental, cromen (α, β-benzo-γ-piran):



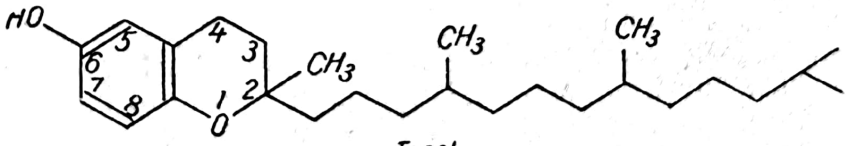
Cromen



Croman

Toţi tocoferolii au substituiţi în poziţia 2 un metil şi un radical saturat cuprinzînd 16 atomi de carbon; în poziţia 6 au un oxidril; şi în celelalte poziţii (5, 7, 8) din nucleul benzenic au substituite una, două sau trei grupări metil.

Compusul fără radicali metil în poziţiile 5, 7 sau 8 este tocolul.



Tocol

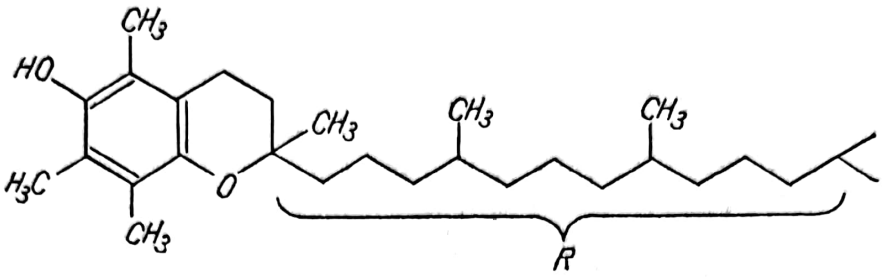
Din tocol derivă, prin diverse metilări, 6 tocoferoli naturali. Numele acestor tocoferoli, poziţiile în care sînt substituite grupările $-CH_3$ şi numele corespunzătoare constituţiei lor, sînt menţionate în tabelul XX.1.

Tabelul XX.1

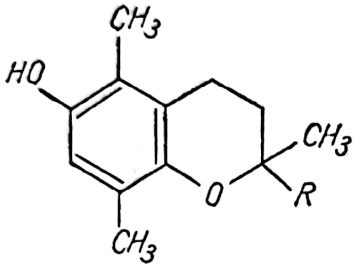
Tocoferol	Poziţii substituite şi nume
	5, 7, 8-trimetil-tocol
α (alfa)	5, 8-dimetil- „
β (beta)	7, 8-dimetil- „
γ (gama)	8-metil- „
δ (delta)	7-metil- „
ε (eta)	5, 7-dimetil- „
ζ (zeta)	

Scanned with OKEN Scanner

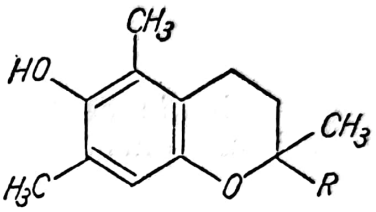
Dintre aceştia, mai activi sînt: α, β, şi ζ-tocoferolii. Formulele lor structurale, potrivit denumirilor, sînt:



α-tocoferolul
(5,7,8-trimetil-tocol)



β-tocoferolul
(5,8-dimetil-tocol)



ξ-tocoferolul
(5,7-dimetil-tocol)

Tocoferolii sînt substanţe uleioase, cu mare vîscozitate, insolubile în apă. Sînt compuşi stabili în aer, la lumină, la încălzire pînă peste 100° şi faţă de acizi. Tocoferolii sînt descompuşi de radiaţiile UV, de hidraţii alcalini şi de oxidanţi. Toţi tocoferolii sînt antioxidanţi.

2.3.3. MODUL DE ACŢIUNE

Acesta nu este total cunoscut; s-au descoperit totuşi o serie de fapte care tind să arate că α-tocoferolul participă în lanţul respirator la procesul de oxido-reducţie biologică, fiind un cofactor implicat în transferul de electroni de la succinatdehidrogenază la coenzima Q. Alte fapte au dovedit că tocoferolii funcţionează ca antioxidanţi împiedicînd autooxidarea uşoară a unor substanţe; spre exemplu, acizii graşi şi vitamina A. Din această cauză, cînd tocoferolii sînt administraţi odată cu vitamina A ei cresc utilizarea acesteia.

Numeroase date, relativ recente, tind să demonstreze intervenţia favorabilă a vitaminei E în biosinteza membranelor. Acest fapt se explică tot prin rolul antioxidant al vitaminei E, inhibînd degradarea oxidativă a acizilor graşi din constituţia membranelor.

Faptul că deficienţa de vitamină E determină intensificarea activităţii anumitor enzime cataboliżante (ribonucleaza, DN-aza, arilsulfataza, catepsinele) a făcut să se considere că această vitamină acţionează ca represor în procesul de biosinteză al proteinelor enzimatice respective. Presupunerea a fost verificată prin numeroase experienţe.

Boli determinate de lipsa vitaminei E. Acestea sînt prezentate în tabelul XX.2. În acelaşi tabel sînt menţionate şi animalele la care s-a determinat boala experimental, ţesuturile afectate şi diverşii factori prin care pot fi

Scanned with OKEN Scanner

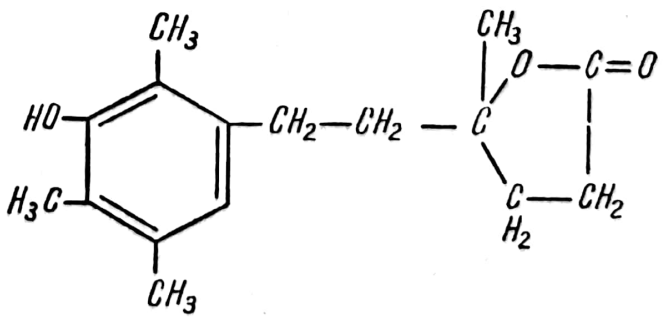
Tabelul XX.2

Bolile determinate de lipsa vitaminei E

Boala	Animalul experimental	Ţesutul afectat	Prevenire cu: Vitamina E	Selenia	Antioxidanţi sintetici	Aminoacizi cu sulf
Deficienţe în reproducere						
Degenerescenţa embrionară Tip A	Femela de şobolan, găină, curcă	Sistemul vascular embrionar	da	nu	da	nu
Tip B	vacă	„	nu	da	nu	nu
Sterilitate	Şobolan, cobai, hamster, cîine	Gonade masc.	da	nu	nu	nu
Afecţiuni la nivelul organelor: ficat, sînge, creier, capilare						
Necroză hepatică	Şobolan, porc	Ficat	da	da	nu	nu
Hemoliză eritrocitară	Şobolan, pui, om	Eritrocite	da	nu	da	nu
Anemie	Maimuţă	Măduva osoasă	da	nu	da	nu
Degenerescenţă renală	Şobolan, maimuţă	Epiteliu tub renal	da	da	nu	nu
Depigmentare	Şobolan	Dinţi incisivi	da	nu	da	nu
Steatoză (încărcare grasă a ficatului)	Porc, pui	Ţesut adipos	da	nu	da	nu
Miopatii nutriţionale						
Distrofie musculară de nutriţie:						
Tip A	Iepure, cobai, maimuţă, şoarece	Muşchi scheletic	da	nu	nu(?)	da
Tip B	miel, viţel, ied	Muşchi scheletic şi cardiac	nu	da	nu	nu
Tip C	Curcan	Inimă	nu	da	nu	nu
Tip D	Pui	Muşchi scheletic	da	nu	nu	da

prevenite bolile respective. Printre aceştia, figurează — alături de vitamina E — diverse substanţe chimice (seleniu, aminoacizi cu sulf, produse sintetice) cu roluri antioxidante. Este de remarcat faptul că nici unul din aceşti antioxidanţi nu exercită acţiuni preventive identice şi nici în toate cazurile.

În organismul omului, după ce îşi îndeplineşte rolul fiziologic caracteristic, vitamina E este degradată prin oxidare, atît la nucleul cromanic cît şi la nivelul catenei. Spre exemplu, din α-tocoferol prin oxidare se formează produsul:



Acest produs se excretă prin bilă, sub formă de conjugat cu două molecule de acid glucuronic. Procesul are loc la nivelul celor două grupe fenolice (fiecare grup —OH conjugîndu-se cu cîte o moleculă de acid glucuronic).

2.3.4. RĂSPÎNDIRE

Vitamina E este abundentă în uleiul de germene de grîu, în alte uleiuri provenind din boabe vegetale (porumb, bumbac, soia); se află apoi în diverse legume: salată verde, mazăre, spanac. Alimente de origine animală bogate în vitamina E sînt: laptele, ouăle, carnea (mușchi), peștele.

2.3.5. NEVOIA DE VITAMINA E

Aceasta nu este foarte bine cunoscută pentru om. Se consideră, totuși, a fi de 0,1—0,2 mg/kilocorp.

2.4. VITAMINA K

2.4.1. EFECTELE CARENȚEI

Vitamina K este vitamina coagulării (Koagulations vitamin) sau vitamina antihemoragică. Ea poartă aceste nume deoarece lipsa ei determină în organism predispoziții la hemoragii (diateze hemoragice) datorate prelungirii timpului de coagulare a sîngelui. Asemenea efecte au fost provocate experimental la puii de găină prin administrarea unor anumite rații sintetice (Dam, 1929). S-a observat însă că dacă aceste rații se suplimentau cu făină de lucernă sau făină de pește, puii de găină hrăniți cu ele nu mai prezentau diateze hemoragice, ceea ce dovedește că asemenea produse alimentare cuprind factorul care previne hemoragiile. Realizîndu-se concentrarea lui din sursele alimentare menționate s-a văzut că acesta este un compus liposolubil și nesaponificabil, căruia Dam i-a dat numele de vitamina K.

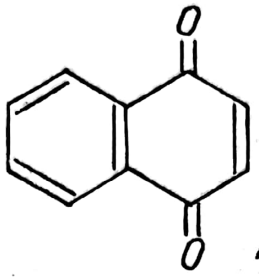
Curînd s-a constatat că substanța cu acțiune antihemoragică izolată din făina de lucernă este diferită de cea din făina de pește, deși au aceeași acțiune vitaminică. Prin urmare, există două vitamine K: vitamina K_1 (abundentă în făina de lucernă) și vitamina K_2 (în făina de pește).

La șobolan sau la alte mamifere, stările de carență nu s-au putut provoca decît mult mai greu, deoarece flora intestinală sintetizează vitamina K absorbabilă în organismul gazdă. La omul adult nu se întîlnesc carențe de vitamine K pentru că ele se află în rațiile obișnuite și pentru că sînt produse de flora intestinală. Vitaminele K sînt absorbabile odată cu grăsimile; cînd absorbția grăsimilor este tulburată (cînd bila nu mai ajunge în intestin), vitaminele K nu sînt nici ele absorbite și apar deficiențe secundare grave. Acestea pot apare și în urma tratamentelor prelungite cu medicamente bacteriostatice. La nou-născut stările de carență în vitamina K sînt mult mai frecvente, producîndu-se accidente hemoragice grave. Ele se pot datora faptului că vitaminele K traversează greu bariera placentară și faptului că nou-născutul nu are floră intestinală formată imediat după naștere pentru a-i îndeplini nevoile de vitamină K. Preventiv, se obișnuiește să se administreze vitamina K mamei în epoca ce precede nașterea, precum și nou-născutului.

Scanned with OKEN Scanner

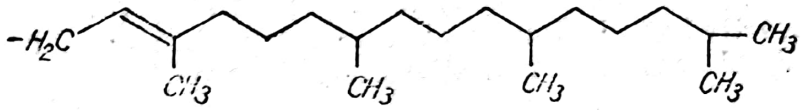
2.4.2. STRUCTURA CHIMICĂ ŞI PROPRIETĂŢI

Din punct de vedere al constituţiei lor chimice, vitaminele K cuprind nucleul p-naftochinonei substituit în poziţia 2 cu un grup metil, iar în poziţia 3 cu un radical (R) numit *fitil* în vitamina K_1 şi *difarnesil* în vitamina K_2.

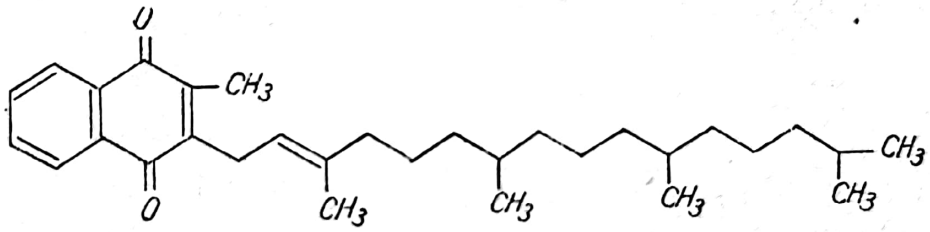


Naftochinona

Radicalul fitil provine din *fitol*, alcool nesaturat cu 20 atomi de carbon din clasa terpenelor.

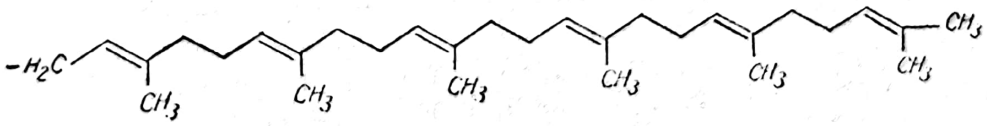


Fitil

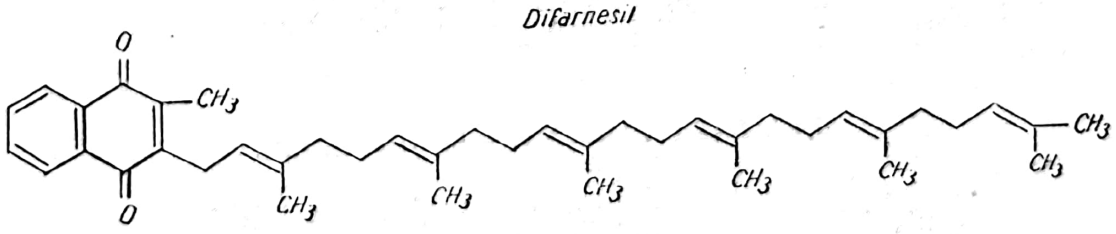


Vitamina K_1

Vitamina K_2 are radicalul (R) provenit din două resturi de alcool polietilenic cu 15 atomi de carbon, tot din clasa terpenelor numit *farnesol*.



Difarnesil



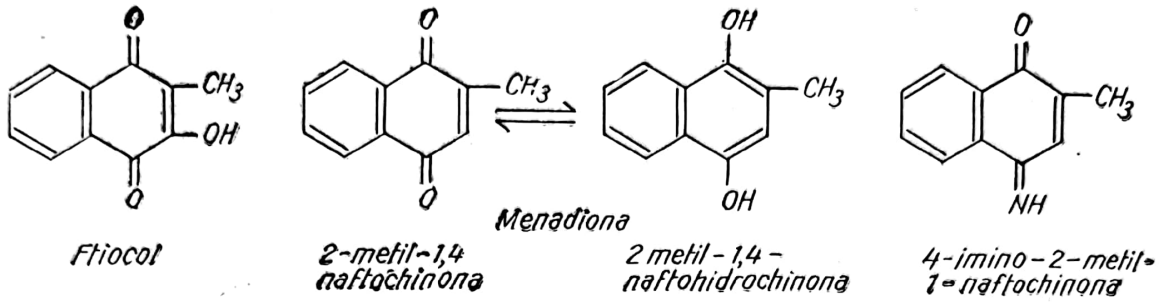
Vitamina K_2

Vitamina K_1 este un lichid vîscos, galben, solubil în solvenţii grăsimilor. Este instabil la lumină şi în aer se oxidează; se alterează şi sub acţiunea hidroxizilor alcalini.

Scanned with OKEN Scanner

Vitamina K_2 este o substanţă solidă prezentîndu-se sub formă de cristale galbene cu p.t. 54°; are aceleaşi proprietăţi chimice ca şi vitamina K_1.

Alte substanţe cu activitate de vitamină K sînt: *ftiocolul* (2-metil-3-hidroxi-naftochinona), constituent al membranei lipidice din bacilul Koch şi produşii de sinteză: *menadiona* (funcţionînd în formă oxidată sau redusă) precum şi *4-imino-2-metil-1-naftochinona:*



Dintre aceşti 3 compuşi, ultimul este foarte activ; are o activitate de patru ori mai mare ca a vitaminei K_1, iar menadiona (în forma redusă) este tot atît de activă ca şi vitamina K_1. În terapeutică se mai folosesc şi alte substanţe de sinteză cu constituţie asemănătoare şi cu activitate de vitamină K.

Structura caracteristică activităţii vitaminei este nucleul naftochinonic substituit cu metil în poziţia 2 (corespunzătoare menadionei). Deci şi în cazul vitaminei K avem de-a face cu mai multe vitamere.

2.4.3. MODUL DE ACŢIUNE

Rolurile vitaminei K nu sînt total cunoscute. Se ştie numai că protrombina care intervine în coagulare nu poate fi sintetizată dacă organismul este carenţat în vitamină K. De aceea, carenţa vitaminei K determină prelungirea timpului de coagulare.

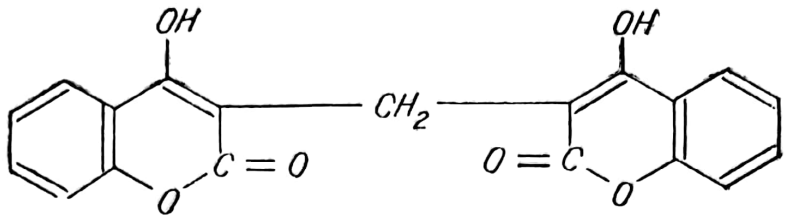
Rolul important pe care-l are vitamina K în formarea protrombinei rezultă imediat din intervenţia ei în trei etape principale din biosinteza acestei glicoproteine: (a) translaţia la nivelul ribozomilor, (b) dezvoltarea catenei polipeptidice şi (c) ataşarea porţiunii hidrocarbonate la catena polipeptidică.

Pe de altă parte, aşa cum s-a arătat la reacţiile lanţului respirator, transportul hidrogenului în reacţiile de oxidoreducţie celulară este efectuat — la un moment dat — de coenzima Q (sau ubichinona) cu structură asemănătoare vitaminelor K.

2.4.4. ANTIVITAMINA K — DICUMAROLUL

În 1940 s-a descoperit o diateză hemoragică la vitele hrănite cu fîn de trifoi mucegăit, datorită prezenţei în acest fîn a unei substanţe numită *dicumarol* care determină întîrzierea coagulării. S-a constatat că prin administrare de cantităţi mici de vitamină K, efectul dicumarolului se înlătură. Deoarece dicumarolul şi vitaminele K au o analogie structurală, se consideră că el ia locul vitaminelor K în reacţii metabolice, nereuşind să disloce vita-

minele decît cînd ele se află în concentraţii mari. Pentru că dicumarolul funcţionează antagonist cu vitamina K el a fost numit *antivitamina K*.



Dicumarol

După cum se va arăta, există antivitamine şi pentru alte vitamine.

3. VITAMINELE HIDROSOLUBILE

Vitaminele hidrosolubile sînt mai numeroase decît cele liposolubile. De fapt, există cel puţin 10 vitamine hidrosolubile bine cunoscute: 9 sînt cuprinse în grupul vitaminelor B, iar a 10-a este vitamina C. Vitaminele din complexul B sînt: tiamina (vitamina B_1), riboflavina (vitamina B_2), niacina, (vitamina PP), piridoxina (vitamina B_6), acidul pantotenic, inozitolul, biotina, acidul folic şi vitamina B_{12}.

3.1. VITAMINA B_1

3.1.1. EFECTELE CARENŢEI

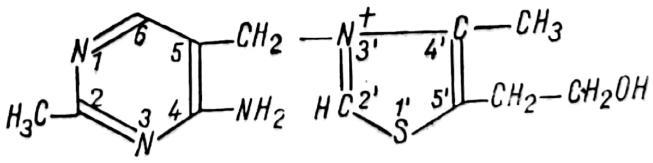
Vitamina B_1 se mai numeşte *aneurină* datorită activităţii sale antinevritice. Într-adevăr, lipsa ei determină la păsări polinevrita aviară iar la om boala numită beri-beri, manifestată — de asemenea — prin tulburări nervoase.

Pe de altă parte, tiamina este factor nutritiv indispensabil pentru animalele superioare şi pentru numeroase microorganisme, care nu cresc decît pe medii cuprinzînd vitamina B_1.

Vitaminei B_1 i se mai spune şi *tiamină*, datorită faptului că în moleculă cuprinde sulf aparţinînd unui nucleu tiazolic (vezi formula). Acest ultim nume — tiamina — este cel mai nou şi cel mai utilizat pentru vitamina B_1.

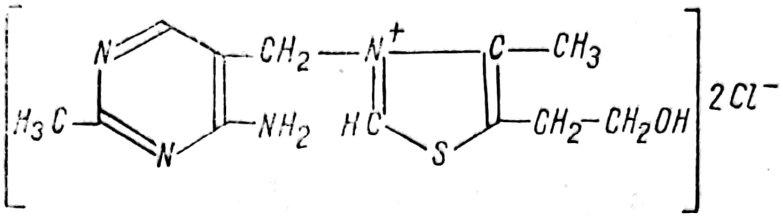
3.1.2. CONSTITUŢIA CHIMICĂ ŞI PROPRIETĂŢI

În constituţia chimică a vitaminei B_1 intră un nucleu pirimidinic şi un nucleu tiazolic. Ambele nuclee sînt substituite în anume poziţii (aşa cum se poate vedea în formulă) şi sînt unite printr-o punte metilenică:

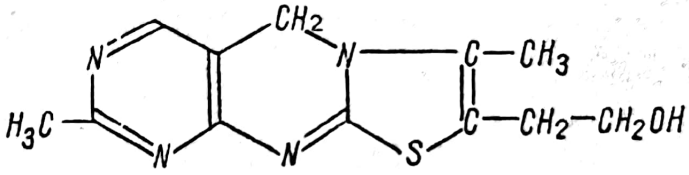


Vitamina B_1

În soluţii, tiamina se află sub formă de ion (cation), iar în stare solidă sub formă de sare (formată prin neutralizarea sarcinii pozitive de către un anion). De obicei, tiamina se obţine în stare solidă, cristalină, în soluţii acide. În acest caz, grupul amino din poziţia 4 a nucleului pirimidinic leagă o moleculă de acid, spre exemplu, acid clorhidric. Se obţine astfel clorhidratul clorurei de tiamină:



Sub formă de sare, tiamina este o substanţă solidă, cristalină, incoloră, solubilă în apă; este stabilă la încălzire dacă se află în stare anhidră. În soluţii apoase — neutre sau alcaline — tiamina se descompune dacă acestea sînt încălzite la fierbere; este mai stabilă în soluţii acide (pH<5). Tiamina nu se oxidează în aer, la temperatură obişnuită. Dacă însă se alcalinizează soluţia sa apoasă şi se tratează cu permanganat de potasiu sau cu fericianură de potasiu, tiamina se oxidează uşor, trecînd în tiocrom.



Tiocrom

Tio cromul are fluorescenţă albastră.

3.1.3. ROL METABOLIC

Acesta se înţelege imediat dacă se precizează faptul că tiamina intră sub formă de ester pirofosforic (tiaminpirofosfat — TPP) — în constituţia enzimelor care decarboxilează acidul piruvic (piruvic-decarboxilaza şi piruvat-oxidaza).

Formarea TPP din tiamină are loc pe seama ATP-ului:

$$\text{Tiamină} + \text{ATP} \rightarrow \text{TPP} + \text{AMP}$$

Aşa cum s-a arătat în Cap. IX, acidul piruvic reprezintă o etapă importantă în metabolizarea glucidelor, atît în organismele inferioare (drojdia de bere), cît şi în cele superioare (om). Pentru ca aceste organisme să poată utiliza pînă la sfîrşit energia eliberată de degradarea glucidelor, este imperios să se decarboxileze acidul piruvic şi produşii rezultaţi să sufere transformări ulterioare. Se înţelege — în aceste condiţii — că organismele trebuie să dispună în permanenţă de enzimele caracteristice decarboxilării acidului piruvic şi implicit de tiamină care intră în constituţia coenzimei acestor enzime. Totodată, se înţelege că în carenţă de vitamină B_1 este stînjenită formarea enzimelor de decarboxilare a acidului piruvic şi prin aceasta se întrerupe întreg metabolismul glucidic. Acidul piruvic ajunge să se acumuleze — ca atare — în organism, ceea ce antrenează o serie de manifestări patologice, caracteristice bolilor de avitaminoză B_1 (crampe musculare, fenomene toxice pentru sistemul nervos, tulburări cardiace, edem).

Scanned with OKEN Scanner

3.1.4. RĂSPÎNDIRE

Vitamina B_1 este mai abundentă în regnul vegetal. Surse bogate în tiamină sînt: orezul, germenii boabelor de grîu, porumb, secară, tărîţele de cereale, fructele (prune, struguri, nuci), legume (mazăre, fasole, linte, sfeclă, lăptuci, spanac).

3.1.5. NEVOI

În medie, omul adult are nevoie de 2 mg vitamină B_1/24 ore; nevoi mai mari au cei care depun activitate musculară intensă şi care au un consum mai mare de glucide ce trebuie metabolizate. În genere, se consideră necesar 1 mg de tiamină pentru 1 000 Kcal produse prin consum de glucide.

3.2. VITAMINA B_2

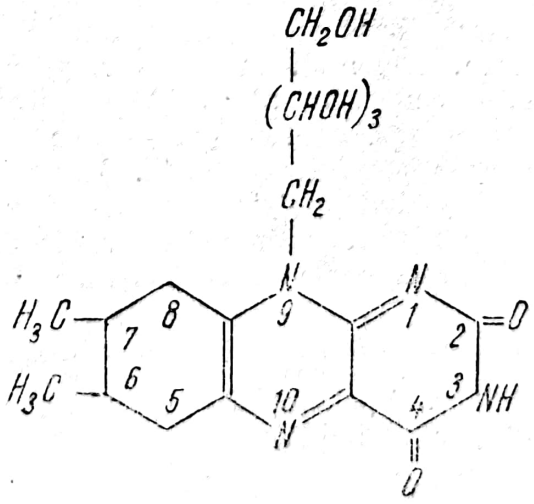
Vitamina B_2 se mai numeşte *riboflavină* potrivit structurii sale de flavină (pigment galben) cu radical ribitil, provenit din ribitol (polialcoolul corespunzător ribozei). I se mai spune şi *lactoflavină* deoarece este o flavină aflată în lapte.

3.2.1. EFECTELE CARENŢEI

Deficienţa de vitamină B_2 se manifestă prin unele leziuni ale pielii, ale mucoaselor (în genere) şi ale corneei. La om, în deficienţă de vitamina B_2 apare frecvent cheiloza, stomatita angulară, însoţită de roşeaţa limbii şi iritaţii în interiorul cavităţii bucale. De asemenea, leziunile corneale apar în urma unei vascularizări ale acesteia şi conduc la ulceraţii.

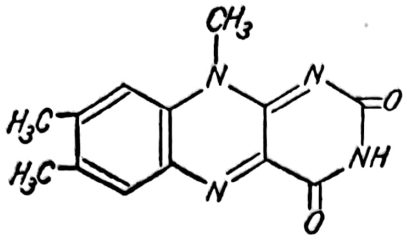
3.2.2. STRUCTURA CHIMICĂ ŞI PROPRIETĂŢI

Riboflavina cuprinde în molecula sa nucleul heterociclului izoaloxazinic substituit în poziţiile 6 şi 7 cu cîte un radical metil, iar în poziţia 9 cu radical ribitil:

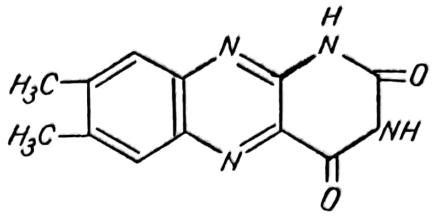


Riboflavina este o substanţă solidă, cristalină, galbenă; este puţin solubilă în apă şi stabilă în soluţii apoase. În asemenea soluţii, cu pH-uri cuprinse între 3 şi 9, riboflavina prezintă în lumină violetă şi ultravioletă o fluorescenţă galbenă-verzuie pe care o pierde însă în soluţii puternic acide (cu pH<3), precum şi în soluţii foarte bazice (cu pH>9). Sub acţiunea unor radiaţii

luminoase intense, riboflavina aflată în mediu alcalin este distrusă parţial trecînd în *lumiflavină* iar dacă se află în mediu acid trece în *lumicrom:*



Lumiflavina



Lumicrom

3.2.3. ROL METABOLIC

Vitamina B_2 intră în constituţia a două substanţe care fac parte din sisteme enzimatice (sînt coenzime) luînd parte la diverse procese de oxido-reducere în organism. Acestea sînt flavin-mono-nucleotidul (FMN) şi flavin-adenin-dinucleotidul (FAD).

3.2.4. RĂSPÎNDIRE

Vitamina B_2 se află mult răspîndită în alimentele de origine animală: lapte, brînză, ouă, carne (ficat) dar şi în unele alimente vegetale (tomate, mazăre).

3.2.5. NEVOI

Necesarul de riboflavină pentru omul adult este de 2 mg/24 ore.

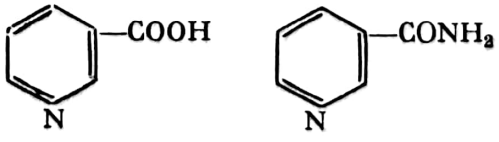
3.3. VITAMINA PP

3.3.1. EFECTELE CARENŢEI

Vitamina PP este vitamina antipelagroasă (factor pelagra preventiv); este vitamina care înlătură simptomele pelagrei, numită şi „maladia celor trei D" (dermatită, diaree, demenţă). Într-adevăr, primul semn al pelagrei este dermatita (eritem, descuamaţii, ulceraţii) provocată de expunerea la soare. Această expunere — după cum se ştie — nu produce nici un fel de tulburări la persoanele cu alimentaţie normală. Al doilea semn al pelagrei îl constituie tulburările digestive (gastrita) care conduc la diaree (eventual cronică). Al treilea simptom îl reprezintă tulburările nervoase şi psihice, întîlnite în special la cei la care boala s-a cronicizat.

3.3.2. STRUCTURA CHIMICĂ ŞI PROPRIETĂŢI

Acţiunea de vitamină antipelagroasă o prezintă atît acidul nicotinic (niacina) cît şi amida sa (nicotinamida):



acid nicotinic

nicotinamida

Acidul nicotinic este o substanţă solidă, cristalină, incoloră, solubilă în apă

(foarte solubilă în baze); nicotinamida este şi ea o substanţă solidă, incoloră, cristalină şi solubilă în apă.

3.3.3. ROL METABOLIC

Ca şi în cazul vitaminei B_2, nicotinamida intră în constituţia grupului prostetic al unor enzime din categoria dehidrogenazelor. Acestea joacă şi ele roluri esenţiale în procesele de oxidoreducţie din organism. Substanţele cuprinzînd nicotinamidă sînt: NAD (nicotinamido-adenino-dinucleotid) şi NADP (nicotinamido-adenino-dinucleotid-fosfat).

3.3.4. RĂSPÎNDIRE

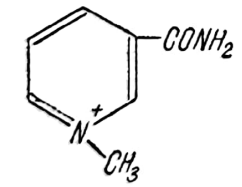
Alimentele relativ bogate în vitamina PP sînt: carnea (în special ficatul) şi făina integrală. O sursă importantă este şi drojdia de bere. Niacina se mai găseşte în unele legume: fasole (soia), mazăre verde, spanac şi cartofi.

3.3.5. NEVOI

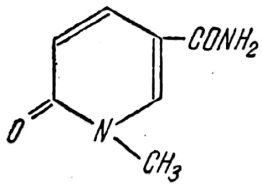
Acidul nicotinic neputînd fi sintetizat în organismul omului (şi al altor animale superioare), trebuie să fie procurat de hrană, ca orice vitamină. Se consideră că nevoia de acid nicotinic pentru omul adult este de 15 mg/24 ore. Trebuie reţinut totuşi faptul că nevoile de acid nicotinic pot fi îndeplinite, în parte, pe seama triptofanului din raţia alimentară (vezi metabolismul acestui aminoacid în Cap. X).

3.3.6. FORMELE DE ELIMINARE

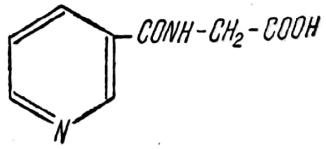
În general, vitaminele sînt dislocate în organism în măsură mai mare sau mai mică. Uneori, dislocarea nu dă naştere la produşi specifici şi vitamina se elimină ca atare; spre exemplu, vitaminele B_1 şi B_2. Alteori, dislocarea dă naştere la derivaţi imediaţi care se excretă, vitamina nefiind excretată în cantităţi mari. Acesta este cazul acidului nicotinic, la om. Cataboliţii principali ai acidului nicotinic, în ordinea importanţei lor, sînt:



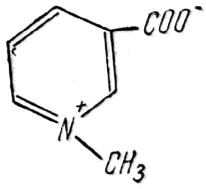
N_1-metil-nicotinamidă



N_1-metil-6-piridono-nicotinamidă



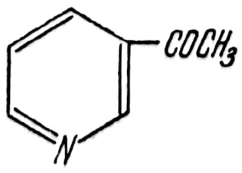
Acid nicotin uric (la cîine)



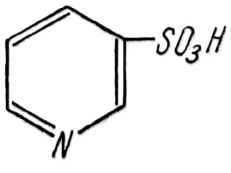
Trigonelina

3.3.7. ANTIVITAMINE PP

Dintre substanţele cu acţiune antivitaminică PP, mai importante sînt 3-acetilpiridina şi acidul piridin-3-sulfonic:



3-acetil-piridina



acid piridin-3-sulfonic

Scanned with OKEN Scanner

3.4. VITAMINA B_6

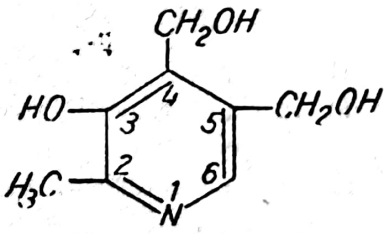
3.4.1. EFECTELE CARENȚEI

Vitamina B_6 se mai numește *piridoxină*, corespunzător constituției sale (alcool cu nucleu piridinic) sau *adermină* în funcție de rolul său fiziologic: vindecă o dermatită specifică a șobolanului. De fapt lipsa vitaminei B_6 determină apariția acestei dermatite numită și acrodinie. Boala se caracterizează prin inflamația și descuamarea pielii extremităților, a vîrfurilor (vîrf în greceşte „akros"). Acrodinia se manifestă — în special — prin descuamarea pielii labelor, botului, urechilor, pleoapelor.

Această vitamină B poartă indicele „6" pentru că atunci cînd se izolau diverși componenți din complexul B s-a presupus că există și factorii: B_3, B_4 și B_5. Ulterior, s-a constatat că acești factori nu există, însă pentru că — între timp — fusese descoperită și piridoxina căreia i se dăduse numele de vitamina B_6, denumirea ei a rămas pînă azi și se mai folosește încă, alături de celelalte două nume menționate.

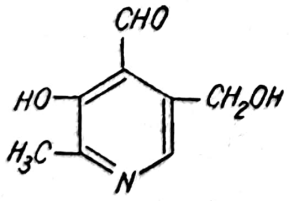
3.4.2. STRUCTURA CHIMICĂ ȘI PROPRIETĂȚI

Vitamina B_6 este un derivat al piridinei, substituit în patru poziții; în 2 cu metil, în 3 cu oxidril, iar în *4* și *5* cu cîte un grup hidroximetil:

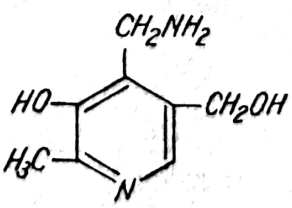


2 — metil — 3 — hidroxi — 4,5 — dihidroximetil — piridină

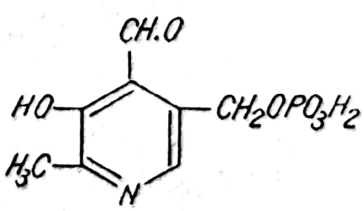
Piridoxina este o substanță solidă, cristalină, incoloră (p.t. 160°). Este solubilă în apă, alcool și acetonă. Este relativ stabilă atît în stare solidă cît și în soluție. Substanța aflată în produsele vegetale sau animale este însoțită de alte două substanțe imediat înrudite: *piridoxalul* și *piridoxamina*, respectiv *aldehida* și *amina* (în poziția 4) corespunzînd piridoxinei:



Piridoxalul



Piridoxamina



Piridoxalfosfatul

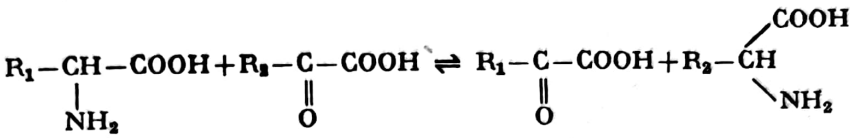
Pentru unele specii (spre ex. șobolanul) piridoxalul și piridoxamina sînt tot atît de active ca și piridoxina; pentru alte specii (spre ex. pentru microorganisme) piridoxalul și piridoxamina sînt de cîteva mii de ori mai active decît piridoxina.

Scanned with OKEN Scanner

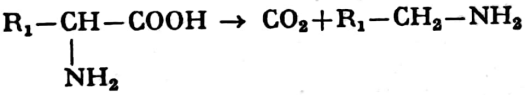
3.4.3. ROL METABOLIC

Piridoxina, sub formă de ester fosforic la oxidrilul din poziţia 5 a piridoxalului (deci ca piridoxalfosfat) participă la o serie de reacţii foarte importante, drept component al sistemelor enzimatice care determină reacţiile respective. Aceste reacţii enzimatice privesc, în special, metabolismul aminoacizilor:

a) *Transaminarea* care constă în transformarea unui aminoacid în ceto-acid prin reacţia aminoacidului cu un ceto-acid ce trece în aminoacid:

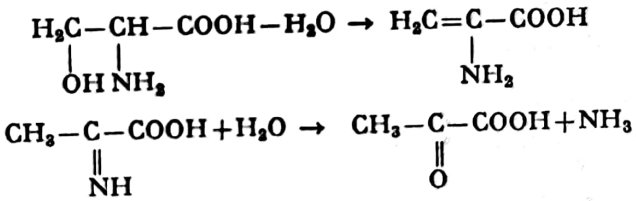


b) *Decarboxilarea* care constă în transformarea unui aminoacid în amină, prin îndepărtarea de CO_2:



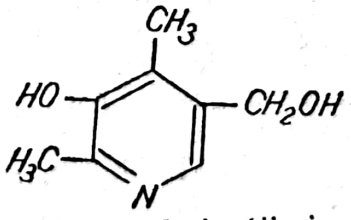
c) *Transulfurarea* (spre exemplu, S din metionină trece la serină pentru a o transforma în cisteină).

d) Eliminarea de apă din serină, sau H_2S din cisteină, urmată de dezaminarea hidrolitică spontană a aminoacizilor corespunzători, rezultînd acidul piruvic şi amoniac. În cazul serinei, reacţia are loc prin următoarele etape:

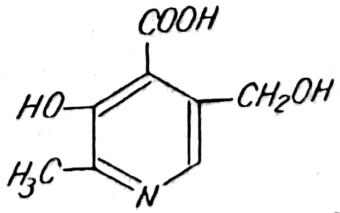


Piridoxalfosfatul este un factor favorizant în transportul aminoacizilor prin mucoasa intestinală, înlesnind absorbţia lor. De asemenea, piridoxalfosfatul este coenzima glicogenofosforilazei, enzimă implicată în degradarea glicogenului.

Antivitamina B_6. Piridoxina are mai multe antivitamine. Dintre antivitamine mai importantă este 4-dezoxipiridoxina:



Forma de excreţie. Piridoxina şi derivaţii ei se excretă de om prin urină, sub formă de acid 4-piridoxic:



3.4.4. RĂSPÎNDIRE

Sursele cele mai bogate în piridoxină sînt: drojdia de bere, tegumentele boabelor diverselor cereale, legumele, carnea (în special, ficatul).

3.4.5. NEVOI

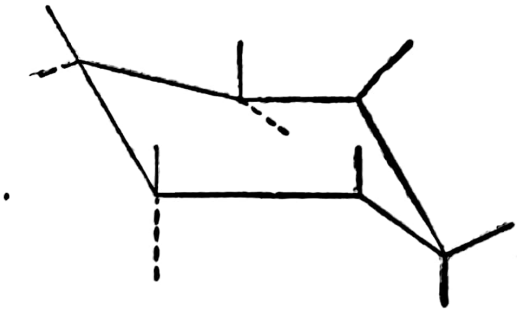
Se consideră că pentru omul adult este nevoie de 2—3 mg/zi piridoxină. Lipsa acestui aport zilnic atrage tulburări în metabolismul sistemului nervos şi al pielii.

3.5. VITAMINELE DIN BIOS

Vitaminele din bios constituie un grup de trei vitamine hidrosolubile care au fost izolate dintr-un extract de drojdie. Acesta a fost numit, înainte de a i se cunoaşte constituţia, *bios*. Cele trei substanţe sînt — în acelaşi timp — factori de creştere pentru microorganisme şi vitamine pentru animale: *mezoinozitolul*, *biotina* şi *acidul pantotenic*.

3.5.1. MEZOINOZITOLUL

Mezoinozitolul este unul din cei 9 izomeri ai hexahidroxiclohexanului (inozitolului) avînd formula:



Mezoinozitolul este o substanţă solidă, cristalină, incoloră cu p.t. 225°, solubilă în apă.

Mezoinozitolul este foarte răspîndit atît în regnul vegetal cît şi în cel animal, în cantităţi îndeajuns de mari. În plante se află sub formă de fitină (sarea de calciu a esterului hexafosforic al mezoinozitolului) iar în regnul animal se află sub formă de fosfatidilinozitoli (ester-fosfatide fără azot).

3.5.1.1. *Efectele carenţei* în această vitamină au fost observate în experienţe făcute pe şoareci cărora li s-a determinat o alopecie dieteră (pierderea părului prin hrănire cu raţii sintetice care nu cuprindeau mezoinozitol). Administrîndu-se însă mezoinozitol animalelor s-a constatat vindecarea. La şobolanii hrăniţi cu raţii sintetice lipsite de mezoinozitol se produce o „alopecie în ochelari" (pierderea părului în jurul ochilor). Şi aceasta se vindecă prin administrare de mezoinozitol. Totodată, substanţa are ca efect prevenirea infiltrării grase a ficatului şobolanilor.

Mezoinozitolul este necesar creşterii drojdiilor; în schimb, bacteriile nu par să aibă nevoie de ionozitol în mediile pe care se dezvoltă. Unele chiar îl sintetizează.

La om nu se cunosc simptome ale carenţei de inozitol.

3.5.1.2. *Rol în organism*. În afară de faptul că mezoinozitolul este un constituent al fosfatidil-inozitidelor, nu se mai cunoaşte vreun alt rol pe care acesta l-ar putea avea în organism.

Scanned with OKEN Scanner

3.5.2. BIOTINA

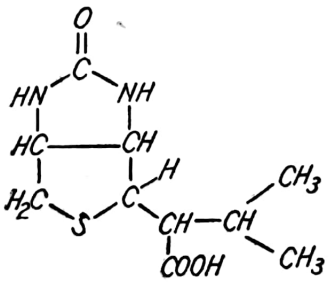
După sursele de izolare, s-au cunoscut două biotine: α-biotina, izolată prima oară în 1936 din gălbenușul de ou și β-biotina, izolată tot pentru prima oară în 1940, din ficat. De altfel, cercetări anterioare (mai vechi decît 1936—1940) arătaseră că biosul — factor dovedit indispensabil pentru animalele de laborator — se află în concentrații relativ mari în gălbenușul de ou și ficat. Se cunoaște și o γ-biotină. Aceasta a fost izolată dintr-un produs comercial de biotină cristalizată.

3.5.2.1. *Efectele carenței*: α- și β-biotina sînt substanțe foarte active în creșterea unei serii de drojdii, ciuperci și bacterii. Totodată, sînt factori indispensabili pentru animale.

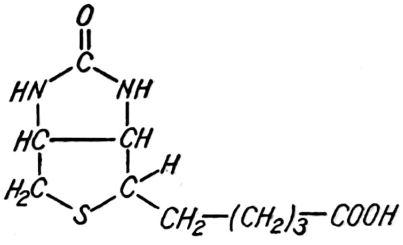
Biotinele devin inactive din punct de vedere biologic în prezența albușului de ou crud deoarece o proteină din albușul de ou crud se combină cu biotina. Această proteină se numește *avidina* (tocmai pentru că este „avidă" de biotină).

Cu ajutorul albușului de ou crud — de fapt a avidinei ce o cuprinde — s-au putut determina carențe experimentale de biotină la șobolan și la alte animale precum și la om. Simptomele carenței la șobolani sînt: dermatite, paralizia părții posterioare a corpului, alopecie în ochelari. Și la puiul de găină s-au observat dermatite grave. La om lipsa de biotină (determinată experimental prin hrănire cîteva săptămîni, cu rații cuprinzînd ou crud) provoacă: dermatită, simptome de oboseală, dureri musculare, anomalii în electrocardiograme. Administrarea unor cantități foarte mici de biotină (150—300 μg/24 ore) înlătură în cîteva zile aceste simptome.

3.5.2.2. *Structura chimică și proprietăți*. Biotinele sînt compuși cu sulf care cuprind ciclul hidrogenat al tiofenului (tetrahidrotiofen) condensat cu ciclul imidazolidinei (tetrahidroimidazolul):



α-biotina



β-biotina

Din punct de vedere chimic, γ-biotina este derivatul α-biotinei substituit la azot cu fenil (N-fenil-biotina).

Biotinele sînt substanțe solide, cristaline, incolore, solubile în apă, stabile la încălzire; sînt însă descompuse de acizi și de baze.

3.5.2.3. *Rol metabolic*. Deficiența de biotină reduce capacitatea organismelor de a efectua unele reacții de fixare a bioxidului de carbon pe anumiți metaboliți; spre ex. carboxilarea acidului piruvic pentru transformarea sa în acid oxalacetic:

$$CH_3-CO-COOH+CO_2 \rightarrow HOOC-CH_2-CO-COOH$$

În această reacție participă, intermediar, biotina care fixează temporar CO_2 și apoi îl transferă substanței ce urmează a se carboxila.

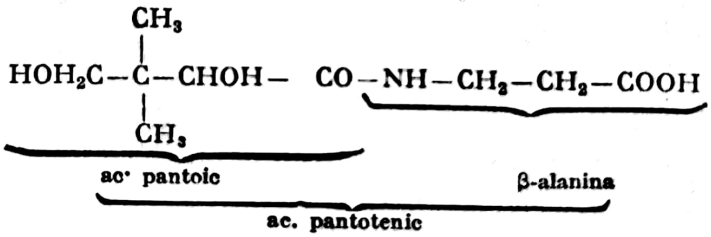
3.5.2.4. *Răspîndire*. Biotinele se află probabil în cantități foarte mici

în toate celulele vii animale şi vegetale. Surse mai bogate sînt: ficatul, gălbenuşul de ou, laptele, drojdia de bere. Biotinele din celule se află combinate cu proteinele de unde sînt liberate prin hidroliză acidă sau enzimatică. Din drojdie s-a obţinut biocitina. Aceasta este β-biotina legată peptidic cu lizina.

3.5.3. ACIDUL PANTOTENIC

Acidul pantotenic este şi el o vitamină din bios; a fost izolat şi i s-a stabilit constituţia în epoca 1930—1940. În această perioadă s-a recunoscut existenţa unui factor extrem de răspîndit în toate ţesuturile animale şi vegetale şi care favorizează creşterea drojdiei de bere şi a altor microorganisme. Pe de altă parte, s-a constatat existenţa unui factor care previne dermatita puilor de găină (alta decît cea determinată de lipsa biotinelor). În sfîrşit, s-a mai dovedit în această epocă existenţa unui factor nutritiv care previne diverse simptome de carenţă la şobolani; în special, *acromotrichia* (încărunţirea blănii şobolanilor negri). Căutînd să se identifice aceşti factori, s-a ajuns să se izoleze o aceeaşi substanţă căreia i se datorau toate efectele menţionate. Substanţa este foarte răspîndită — aproape peste tot — şi este un acid; de aceea, primul cercetător care a obţinut-o în stare pură a numit-o *acid pantotenic*.

3.5.3.1. *Structura chimică şi proprietăţi.* Structura acidului pantotenic a fost stabilită în 1940, fiind confirmată prin sinteză. Substanţa, care este un ulei galben-vîscos, solubil în apă, dă prin hidroliză acidă β-*alanină* şi un acid dihidroxilat care poate fi privit drept un derivat al acidului butiric: ac. 2,4-dihidroxi-3,3-dimetil-butiric sau *acid pantoic*. Aceşti doi constituenţi sînt uniţi în molecula vitaminei printr-o legătură peptidică:



3.5.3.2. *Rol metabolic.* Principalul rol al acidului pantotenic este faptul că el intră în constituţia *coenzimei A*. După cum s-a arătat în capitolele privind metabolismul intermediar, această substanţă participă la numeroase procese biochimice fundamentale; mai ales, la degradarea oxidativă a catenelor hidrocarbonate.

3.5.3.3. *Nevoi.* La om nu se cunoaşte un sindrom determinat de carenţa acestei vitamine; probabil pentru că este foarte răspîndită în mai toate alimentele şi pentru că este sintetizată de către flora intestinală.

3.6. ACIZII FOLICI

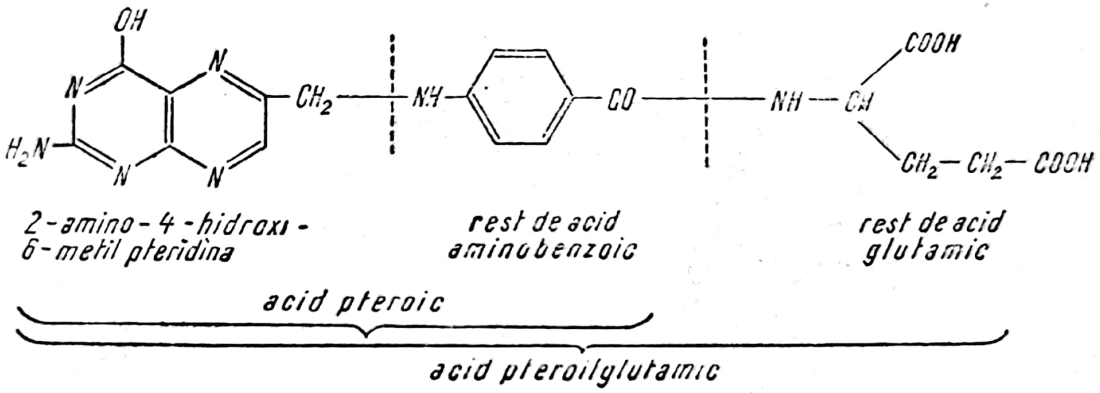
Efectele carenţei. Ca şi alte vitamine din complexul B, acizii folici sînt substanţe cu rol de factori de creştere pentru microorganisme şi cu rol de vitamine pentru organismele superioare. Carenţa de acizi folici a fost întîlnită încă din 1919, la maimuţă iar ulterior şi la puii de găină. Această carenţă a fost determinată şi experimental la diverse animale (pui de găină, curcan, şobolan, cobai, cîine, maimuţă) în special, prin administrare de sulfamide cu acţiune asupra florei intestinale, deoarece flora intestinală sintetizează unii acizi folici care sînt utilizaţi de animalul gazdă.

Scanned with OKEN Scanner

Dintre simptomele carenţei de acizi folici, cele mai caracteristice sînt cele de anemie gravă, de tip megaloblastic, macrocitar şi hipercrom. Aceasta înseamnă că în sîngele circulant se găsesc forme primitive de celule roşii, cu dimensiuni mari (9 μ) şi foarte bogate în hemoglobină. La om ele apar în anemia pernicioasă dar aceasta este ameliorată numai tranzitor prin tratament cu acid folic.

Structuri chimice şi proprietăţi. Din frunzele de spanac s-a izolat în 1944 o substanţă cu caracter acid căreia i s-a spus *acid folic* (folia—frunze) şi care s-a dovedit activă ca vitamină pentru animale sau ca factor de creştere pentru microorganisme. Acidul folic este o substanţă galbenă, cristalină, puţin solubilă în apă; este însă mai uşor solubilă în soluţii alcoolice diluate.

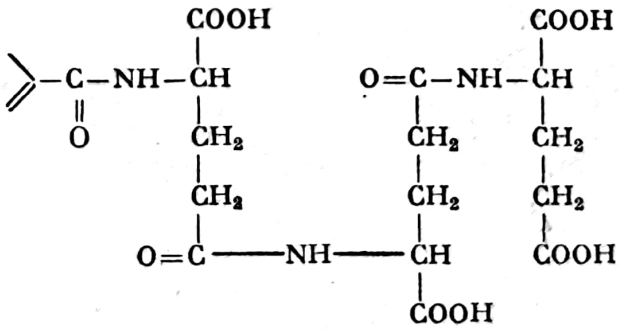
Constituţia acidului folic este următoarea:



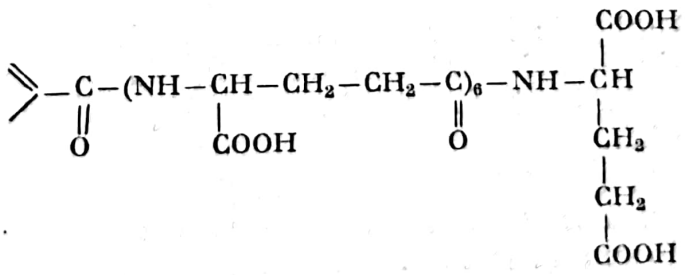
Ea a fost confirmată prin sinteză.

Dintre substanţele care prezintă aceeaşi acţiune vitaminică şi sînt imediat înrudite cu acidul folic mai fac parte:

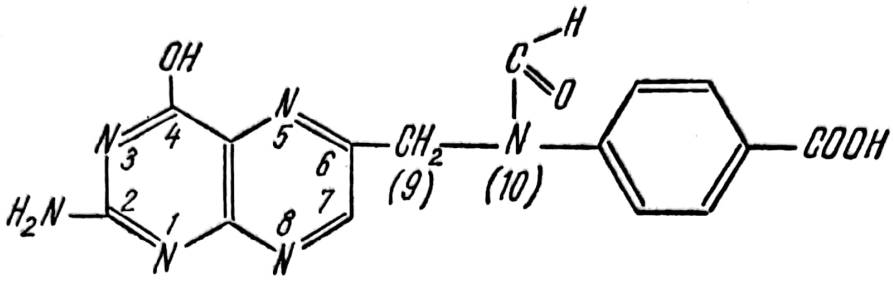
a) *Acidul pteroiltriglutamic* (pteroil-di-γ-glutamil-glutamic)



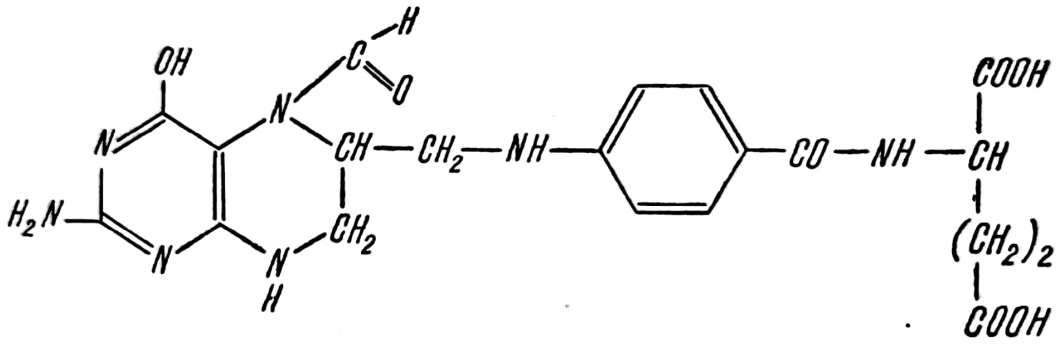
b) *Acidul pteroilheptaglutamic* (pteroil-hexa-γ-glutamil-glutamic) care are aceeaşi constituţie ca substanţa precedentă dar cuprinde 7 resturi glutamice legate împreună:



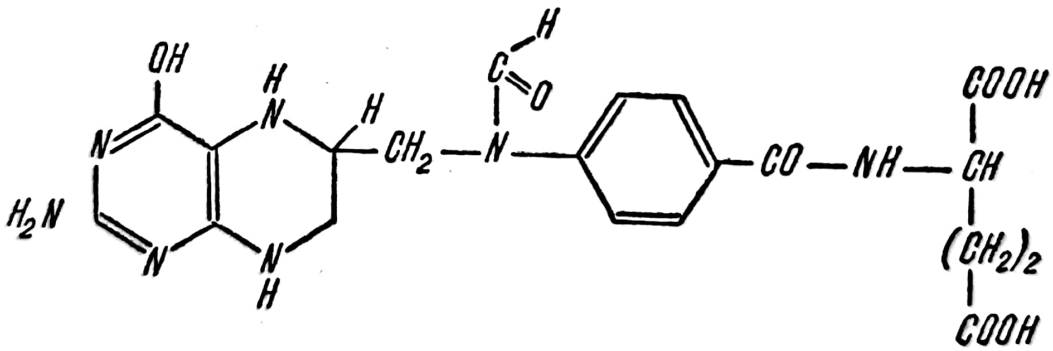
c) *Acidul formilpteroic* sau *rizopterina* care cuprinde o grupare *formil* substituită la atomul de azot în poziţia (10):



d) *Acizii folinici* sînt şi ei alţi membri din grupul acizilor folici. Acidul folinic propriu-zis este derivatul formilat la N (5) al acidului 5, 6, 7, 8-tetrahidrofolic:



În procesele biochimice din organism, participă însă aşa-numitul *acid folic activ* care este un acid folinic cu grup formil în poziţia 10:



acid 10-formil-,5, 6, 7, 8-tetrahidrofolic (ac. folic activ)

Rol metabolic. Acidul folic activ îndeplineşte în organism roluri esenţiale. În primul rînd, participă la transferul de grupe cuprinzînd un atom de carbon: metil ($-CH_3$), formil ($-CH=O$), hidroximetil ($-H_2C-OH$), formimino ($-HC=NH$) prin derivaţii folinici prezentaţi în tabelul IV.2. Asemenea reacţii asigură: interconversiunea metionină—colină, conversiunea uracilului în timină (la formarea ADN-ului), sinteza N-formil-metioninei (implicată în reacţia de iniţiere a biosintezei proteinelor), transformarea glicocolului în serină.

În al doilea rînd, acidul folic participă şi la sinteza bazelor purinice din acizii nucleici (prin procurarea atomilor de carbon C_2 şi C_8). Acest fapt, împreună cu participarea sa la formarea timinei (bază pirimidinică din ADN)

subliniază rolul fundamental pe care-l joacă acidul folic în creşterea şi reproducerea celulară. Legînd acest rol de faptul că celulele sanguine sînt supuse unui ritm rapid de sinteză şi dislocare, se înţelege uşor de ce deficienţa de acid folic se traduce prin anemie caracteristică, menţionată la început. Pe de altă parte, se înţelege şi de ce formarea leucocitelor este inhibată imediat de antagoniştii acidului folic.

Antagonişti. Dintre aceştia fac parte: acidul 4-aminofolic (aminopterina) şi acidul 4-amino-10-metil-folic (ametopterina), sulfanilamida. Aceasta din urmă, $H_2N-C_6H_4-SO_2NH_2$, este analogă cu acidul p-aminobenzoic, $H_2N-C_6H_4-COOH$, component indispensabil în biosinteza acidului folic. Prezenţa sulfanilamidei împiedică participarea acidului p-aminobenzoic la sinteza acidului folic, la microorganisme.

3.7. VITAMINA B_{12}

Efectele carenţei. Vitamina B_{12} este considerată drept factorul antipernicios căci lipsa ei din organism determină anemia pernicioasă numită şi boala Biermer iar administrarea parenterală a vitaminei are ca efect înlăturarea bolii.

Anemia pernicioasă, sau boala Biermer, este o anemie macrocitară, hipercromă, însoţită de: leucopenie, tulburări nervoase (datorate unor leziuni ale măduvei spinale) şi tulburări interesînd tractul digestiv (în special, aclorhidrie). Anemia propriu-zisă se datoreşte incapacităţii măduvei de a produce globule roşii normale. În aceste cazuri globulele roşii circulante sînt — în mare măsură — forme primitive şi cu viaţă scurtă.

Cui se datoreşte faptul că măduva nu produce globule ce pot ajunge la maturitate? Conform unei teorii emise de Castle, există un factor antipernicios indispensabil pentru producerea de globule roşii normale. El ia naştere în urma interacţiunii unui *factor extrinsec* — din alimente — care de fapt este vitamina B_{12} — cu un *factor intrinsec*, produs mai ales de mucoasa gastrică. Pe măsură ce este format şi absorbit, factorul antipernicios se depune în ficat (unde se află în cantitate relativ mare). La bolnavii cu anemie pernicioasă mucoasa gastrică nu produce factor intrinsec, astfel încît ei nu-şi pot împlini nevoia de factor antipernicios şi acesta trebuie să fie furnizat ca atare (sub formă de ficat sau extract de ficat).

Factorul antipernicios este totodată şi factor indispensabil de creştere pentru unele microorganisme.

Structura chimică şi proprietăţi. Structura vitaminei B_{12} este dată în fig. XX.3. Datorită faptului că ea cuprinde un grup —CN, se mai numeşte şi ciancobalamină. Alte substanţe cu acţiune de vitamina B_{12} au constituţie asemănătoare ciancobalaminei dar în loc de grupul —CN cuprind unul din grupele electronegative: —OH, $-NO_2$, —NCS. S-au mai descoperit şi pseudovitamine B_{12}, diferind prin nucleotid. Unele cercetări relativ recente au dus la concluzia că în constituţia vitaminei B_{12}, în locul grupului —CN poate exista chiar un rest adenozil, unit covalent cu un ion monovalent de cobalt. Structura unei astfel de vitamine B_{12} este dată în fig. XX.4.

Ciancobalamina (vitamina B_{12} propriu-zisă) este o substanţă solidă, cristalină, constituită de ace roşii-rubinii, stabilă pînă la cca 300°. Este solubilă în apă.

Scanned with OKEN Scanner

Rol metabolic. Cel mai bine înţeles dintre rolurile metabolice ale vitaminei B_{12} este cel jucat în formarea grupărilor metil mobile (sau labile) ca cea din metionină.

După cum s-a menţionat, încorporarea de grupări cu 1 C în metaboliţi se face cu participarea acidului folic însă în formarea grupărilor metil labile

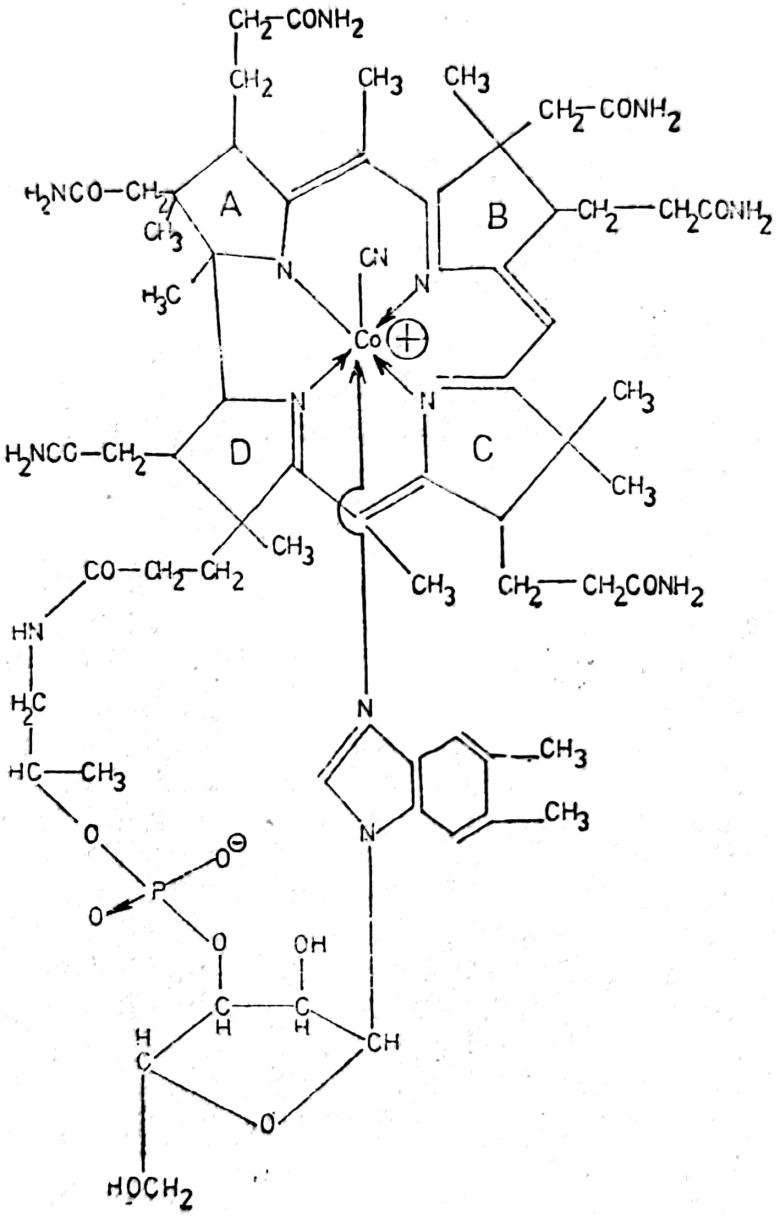


Fig. XX.3. Vitamina B_{12} (ciancobalamina).

joacă un rol esenţial şi vitamina B_{12}. Aceasta s-a dovedit în experienţe de felul următoarei: metionina este aminoacid esenţial pentru şobolani; însă puii de şobolan se pot dezvolta în condiţii normale — chiar hrăniţi cu raţii din care metionina este complet exclusă — dacă raţiile cuprind homocisteină (care prin metilare se poate transforma în metionină) şi, în mod obligatoriu, acid folic şi vitamina B_{12}. În lipsa vitaminei B_{12} animalele nu-şi pot împlini nevoile de metionină şi creşterea încetează.

Vitamina B_{12} participă şi la sinteza timidinei (şi a altor nucleozide), precum şi la sinteza proteinelor. În genere, se consideră că participarea vita-

Scanned with OKEN Scanner

minei B_{12} la procesele metabolice menţionate este secundară, ea fiind factor indispensabil la sinteza unor proteine enzimatice sau coenzime intervenind în procesele respective; joacă rol de coenzimă, în special, pentru unele transmetilaze şi izomeraze (mutaze).

Răspîndire. Surse bogate în vitamină B_{12} sînt: ficatul şi făina de peşte. Ţesutul muscular cuprinde relativ puţină vitamină B_{12}.

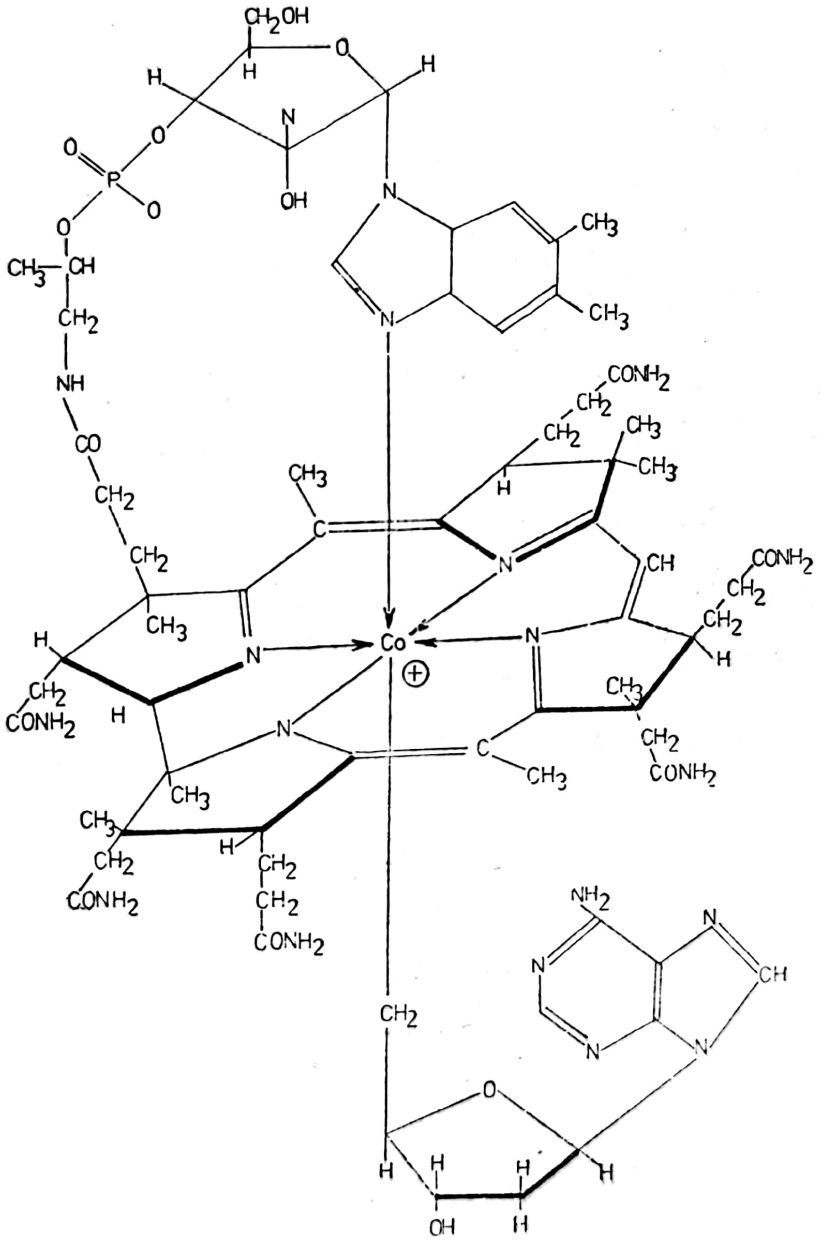


Fig. XX.4. Vitamina B_{12} (adenindezoxinucleozidcobalamină).

Nevoi. Vitamina B_{12} este una din cele mai active substanţe cunoscute. Administrarea unei cantităţi de cca 1 microgram unui bolnav de

Scanned with OKEN Scanner

anemie, duce la activarea imediată şi puternică a hematopoiezei. 1 μg ($=10^{-6}$ g) este $1{,}5 \times 10^{-11}$ din greutatea corpului (cca 1/100 miliarde).

3.8. VITAMINA C

3.8.1. EFECTELE CARENŢEI

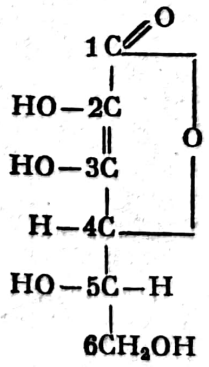
Vitamina C este vitamina a cărei carenţă determină *scorbutul*; de aceea se mai numeşte şi *acid ascorbic* (*a*=fără; *scorbic*=rădăcina cuvîntului scorbut). Substanţa este efectiv un acid organic (structura sa este dată mai departe).

Boala determinată de lipsa vitaminei C — scorbutul — se întîlneşte la om, unele maimuţe, cobai şi liliac. Acestea sînt singurele animale care nu-l pot sintetiza. Simptomele scorbutului sînt: (1) fragilitate capilară cu hemoragii (discrete) la nivelul pielii, mucoaselor, articulaţiilor şi periostului; (2) inflamaţii necrotice ale gingiilor, mobilitatea şi căderea dinţilor; (3) leziuni ale oaselor (la copii, oasele sînt rarefiate şi deosebit de fragile).

O cauză generală a simptomelor scorbutului este reprezentată de anomaliile care au loc în formarea şi calitatea substanţei fundamentale din ţesuturi. Ca urmare a acestui fapt, apar leziuni ale endoteliului capilarelor, ale matricei oaselor şi alte asemenea modificări. Acidul ascorbic este implicat în sinteza colagenului; în special, la formarea hidroxiprolinei din prolină (aminoacizi intrînd în constituţia colagenului în proporţie mare).

3.8.2. STRUCTURA CHIMICĂ ŞI PROPRIETĂŢI

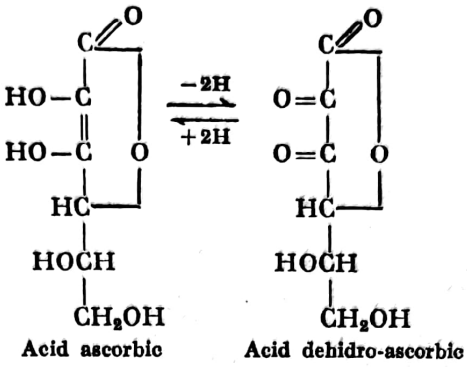
Acidul ascorbic poate fi considerat ca γ-lactona acidului L-gulonic. Acesta este un acid cu 6 C (acid hexuronic) care cuprinde în moleculă şi 4 grupe OH: două alcoolice (la C_5 şi C_6) şi două enolice (la C_2 şi C_3). În scrierea formulei structurale a acidului ascorbic trebuie să se ţină seama că atomul de carbon C_5 are configuraţie stîngă. Formula structurală a acidului ascorbic este:



Acidul ascorbic este o substanţă cristalină cu p.t. 192°. Se dizolvă uşor în apă dînd soluţii acide. Aciditatea se datoreşte însă disocierii de ioni H^+ de la grupele enolice, căci grupul —COOH este blocat în legătură lactonică. Acidul ascorbic prezintă spectru de absorbţie în ultraviolet; este optic activ (dextrogir). Din punct de vedere chimic este o substanţă reducătoare. Oxidarea lui are loc uşor, mai ales în mediu alcalin sau prin ridicarea temperaturii. Această oxidare constă într-o dehidrogenare. În mediu reducător, acidul dehidroascor-

Scanned with OKEN Scanner

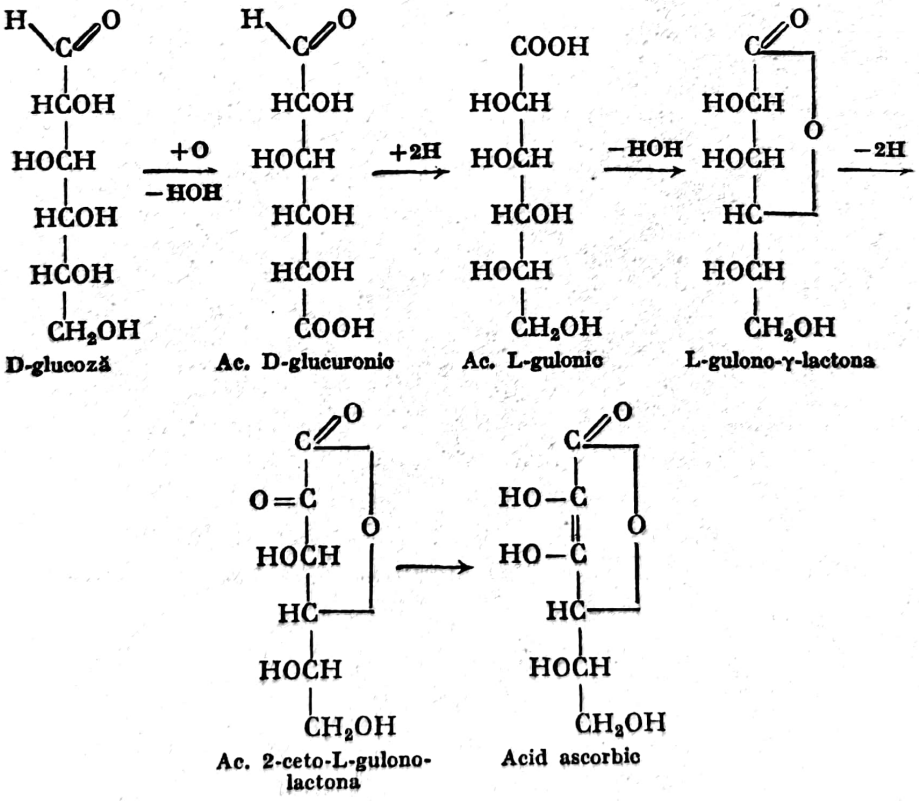
bic fixează doi atomi de hidrogen (cîte unul la fiecare grup cetonic) şi reface acidul ascorbic în forma dienolică. Deci:



3.8.3. BIOSINTEZA ACIDULUI ASCORBIC

Acidul ascorbic este sintetizat atît de plante cît şi de majoritatea animalelor.

În organismele vegetale şi animale acidul ascorbic se formează din zaharuri simple (hexoze). Cercetări făcute cu ajutorul izotopilor radioactivi au dovedit formarea vitaminei C din glucoză şi galactoză în organismul şobolanului. Calea probabilă de biosinteză din D-glucoză este dată în schema următoare:



După cum se poate observa din schemă, biosinteza acidului ascorbic implică inversiunea configuraţiei D a zaharului în configuraţia L a acidului ascorbic (singura activă din punct de vedere biologic).

Scanned with OKEN Scanner

Acţiunea biologică specifică a vitaminei C reclamă şi păstrarea în moleculă a grupelor enolice libere pentru a fi capabile să treacă în forme cetonice (în mediu oxidant). În organism există enzime specifice care înlesnesc trecerea acidului ascorbic dintr-o formă în cealaltă. Spre exemplu: ascorbat-oxidaza care catalizează oxidarea acidului ascorbic acţionînd asupra formei *L-endiolice* şi dehidroscorbat-reductaza care catalizează reducerea formei cetonice în formă dienolică.

3.8.4. ROL METABOLIC

Ca atare sau sub formă de acid dehidro-ascorbic, vitamina C participă la unele transformări pe care le suferă în organism diverse categorii de substanţe: aminoacizi, steroizi, acid folic etc.

În majoritatea cazurilor, aceste transformări constau în hidroxilări; la reacţii participînd oxigen molecular şi acidul ascorbic (în formă redusă):

$$R-H+\text{Ac. ascorbic}+O_2 \rightarrow R-OH+\text{Ac. dehidroascorbic}+H_2O$$

Tabelul XX.3

Unele reacţii metabolice la care participă acidul ascorbic

Reacţia	Tipul de reacţie
Prolina ⟶ Hidroxiprolina	hidroxilare } Cu participarea acidului ascorbic
Dopamina ⟶ Noradrenalina	hidroxilare }
Steroid ⟶ Hidroxisteroid	hidroxilare }
Triptofan ⟶ 5-Hidroxitriptofan	oxidare cu participarea acidului dehidroascorbic
Acid folic ⟶ Acid tetrahidrofolic	hidrogenare cu participarea acidului ascorbic

Se cunosc însă şi hidroxilări care se fac pe seama acidului dehidroascorbic. În aceste cazuri, odată cu hidroxilarea altei substanţe are loc şi reducerea formei oxidate a acidului ascorbic. Alteori, transformările constau numai din hidrogenări efectuate pe seama acidului ascorbic (forma redusă).

În tabelul XX.3 se menţionează cîteva reacţii metabolice în care intervine acidul ascorbic (forma redusă sau oxidată) precizîndu-se totodată şi tipul de reacţie corespunzător.

Unele cercetări recente au pus în evidenţă şi intervenţia favorabilă a acidului ascorbic în activitatea hormonală. Aceasta se înţelege uşor dacă se iau în considerare următoarele: (1) activitatea multor hormoni este mediată de AMP-ul ciclic; (2) formarea AMP-ului ciclic este catalizată de adenilciclază care — la rîndul ei — este activată de catecolamine (adrenalină); (3) biosinteza catecolaminelor are loc cu participarea acidului ascorbic în procesul de hidroxilare. Aşadar, un nivel optim de vitamină C în organism asigură biosinteza corespunzătoare de adrenalină necesară activării adenilciclazei care catalizează formarea de AMP-ciclic necesar unei bune activităţi hormonale.

Scanned with OKEN Scanner

3.8.5. RĂSPÎNDIRE

Toate legumele verzi şi fructele cuprind cantităţi apreciabile de acid ascorbic. Dintre legume sînt deosebit de bogate: ardeii, varza, castraveţii şi tomatele, care cuprind de la cîteva zeci de miligrame de acid ascorbic la 100 g (produsele sînt enumerate în ordinea bogăţiei descrescînde în vitamină). Fructele cele mai bogate în vitamină sînt: portocalele, lămîile, fragii, coacăzele, zmeura şi murele. Ele cuprind de la cca 6 la 60 mg acid ascorbic/100 g. Este de remarcat că deşi cartofii cuprind relativ puţin acid ascorbic (în medie cca 10 mg/100 g) ei reprezintă o sursă importantă de vitamină C pentru persoanele care îi consumă în cantităţi mari. În regnul animal vitamina C se află în cantitate mică (se află mai ales în colostru şi în laptele de femeie).

3.8.6. NEVOI

La indivizii normali şi bine hrăniţi, concentraţia acidului ascorbic în plasmă („ascorbemia") este cuprinsă între 0,8—1,2 mg/100 ml. La scorbutici ea este nulă. Primăvara, în regiunile unde nu se consumă fructe şi legume verzi şi nici cartofi, ascorbemia ajunge la cîteva zecimi de miligram: 0,2—0,4 mg în 100 ml plasmă iar la persoanele care se hrănesc insuficient şi defectuos, ea poate să fie practic nulă.

Cînd li se administrează oral o doză de 10 mg/kilocorp acid ascorbic, indivizii sănătoşi şi bine hrăniţi, elimină prin urină în 24 de ore de la administrare, cel puţin 50% din doză iar cei care se hrănesc cu raţii deficiente elimină fracţiuni mult mai mici, eventual neglijabile (după gravitatea carenţei de care suferă).

Plecîndu-se de la aceste constatări şi cercetînd cît acid ascorbic trebuie să conţină raţiile alimentare pentru ca ascorbemia să fie cuprinsă între 0,8 şi 1,2 mg/100 ml, s-a ajuns la concluzia că nevoile de vitamină ale persoanelor normale sînt împlinite cînd raţia zilnică cuprinde 1 mg acid ascorbic/kilocorp. Totuşi, această cantitate este considerată ca minim necesară pentru desfăşurarea în condiţii normale a proceselor metabolice din organismul sănătos în care este implicat acidul ascorbic. Există însă numeroase maladii şi disfuncţii în care se impun aporturi sporite de vitamina C. Printre acestea se numără: stările nervoase, unele boli virale (printre care şi gripa), boala canceroasă şi unele tulburări cardiovasculare. În fiecare din aceste situaţii, acidul ascorbic intervine — la un moment dat — printr-unul din rolurile sale metabolice, menţionate anterior.

Scanned with OKEN Scanner

Capitolul XXI

BIOCHIMIA RĂSPUNSULUI IMUN

1. GENERALITĂŢI

Răspunsul imun* reprezintă un ansamblu de modalităţi reacţionale specifice ale unui organism sau a unui anumit sistem celular, declanşate prin contactul cu o substanţă străină — o proteină sau altă macromoleculă străină speciei — introdusă în interiorul acestuia. În mod restrîns răspunsul imun are înţelesul de producere de anticorpi specifici faţă de un anumit corp străin denumit antigen** în înţelesul generator de reacţii îndreptate împotriva sa însuşi (anticorpii).

Concepţiile fundamentale asupra imunităţii sînt legate de opera cîtorva mari personalităţi ca Pasteur, Mecinicov, Erlich, care au elaborat primele teorii generale asupra imunităţii umorale şi celulare. Imunochimia — termen creat de Svante Arrhenius în 1907 — dezvoltată ulterior, a fost fondată prin lucrările lui Landsteiner şi a evoluat prin continua împletire cu biochimia, prin contribuţiile aduse de Heidelberger, Haurovitz, Westphal, Lederer, Morgan şi Kabat, Burnet, Medawar, Porter, Edelman etc.

Răspunsul imun — ale cărei baze moleculare sînt din ce în ce mai bine înţelese — constituie fundamentul întregului domeniu al imunologiei.

Datele de compoziţie, structură, situsuri active şi metabolism ale antigenelor şi anticorpilor fac azi obiectul unei discipline speciale, *imunologia moleculară*. Aceasta deschide nu numai perspectiva unei înţelegeri mai profunde a proceselor imunitare, ci şi a unor probleme de biologie moleculară ca: *„recunoaşterea" moleculelor între ele*, reglarea funcţiei genetice în organismele superioare, carcinogeneza şi alte mecanisme de producere a bolilor (*patologia imună*). *Răspunsul imun* este un produs recent al evoluţiei biologice; el se manifestă numai la vertebratele superioare. La vertebratele inferioare mecanismele imune lipsesc sau sînt incomplete; la acestea, fagocitoza reprezintă modul primar de apărare.

Reacţia *antigen anticorp* se produce avînd la bază *principiul complementarităţii*. Situsurile de legătură ale anticorpilor reflectă complementar trăsăturile structurale specifice ale antigenului. Aceste legături fac posibilă formarea unor reţele tridimensionale cu molecule alternante de antigen-anticorp (fig. XXI.1).

---

* *Etimologic*, cuvîntul derivă din latinescul *immunis*, cu înţelesul de a fi scutit sau ferit de ceva (de dări, de sarcini).

** Termenul antigen, derivă din două cuvinte greceşti, *anti* şi *gennan* (a produce).

Scanned with OKEN Scanner

Animalele pot fi imunizate simultan chiar față de un număr mare de macromolecule diferite (incluzînd și variați derivați sintetici ai acestora), pe care nu le-au întîlnit vreodată în habitatul lor natural*.

Specificitatea anticorpilor reflectă relațiile filogenetice. Anticorpul față de o proteină de la o anumită specie nu reacționează cu proteina omoloagă de la o specie taxonomic îndepărtată. Diferențele *structurale* ale proteinelor omoloage, de la diferite specii, sînt rezultatul secvenței aminoacizilor componenți ai lanțurilor polipeptidice respective.

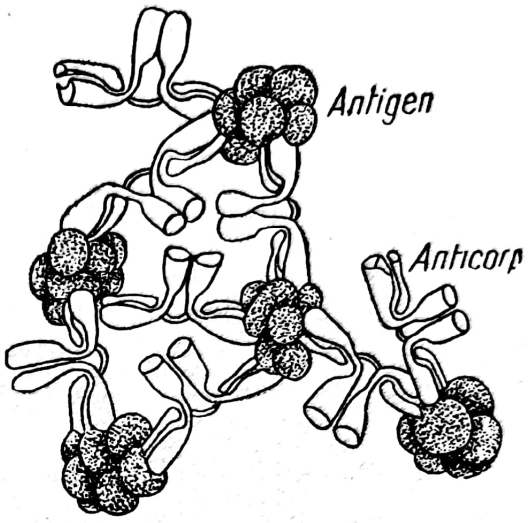


Fig. XXI.1. Rețea tridimensională antigen-anticorpi (adaptat după Lehninger).

2. MODALITĂȚI REACȚIONALE ALE ORGANISMULUI

Conceptul inițial de imunitate se referă la apărarea contra infecțiilor și are înțelesul de stare de rezistență *specifică antiinfecțioasă* ce se instalează ca urmare a contactului activ cu agentul cauzal al bolii. *Conflictul* între antigenul patogen și organism în diferitele sale forme, este întemeiat pe două *modalități reacționale.*

2.1. REZISTENȚA GENERALĂ NESPECIFICĂ

Aceasta are la bază fie nereceptivitatea celulelor pentru un agent patogen, fie reacțiile nespecifice față de diferite tipuri de agresiune patogenă. Filogenetic privit, procesul de apărare este reprezentat primar, prin mecanismele de apărare nespecifice. În această modalitate ce cuprinde componente active celulare și umorale sînt implicate: SRE** — în special macrofagele — și importante componente solubile: complementul, lizozimul, properdina, polipeptide bazice, histone.

2.2. IMUNITATEA SPECIFICĂ DOBÎNDITĂ

Ea este condiționată de producerea anticorpilor specifici față de agentul agresor, patogen. Reacțiile antigen-anticorp prezintă numai o parte din capacitatea de apărare a organismului, ce este completată prin componentele plasmatice menționate ca elemente ale reactivității nespecifice.

Pe de altă parte, trebuie subliniat că răspunsul imun poate fi:

— *umoral*, caracterizat prin producerea de anticorpi (*imunoglobuline*) secretate de plasmocite și limfocite și eliberate în plasmă;

---

* Capacitatea vertebratelor de a forma mai mulți anticorpi specifici simultan, ca răspuns la mai mulți antigeni, ar putea fi o *reminiscență* a aptitudinii de a forma diferite enzime (proteine) ca răspuns la mai multe molecule inductoare (facultate manifestată la ființele inferioare).

** Denumit recent „*SIC*" = sistemul imunității celulare — sau „*SCIC*" = sistemul celular i munocompetent.

— *celular*, caracterizat prin apariţia de limfocite specific sensibilizate, factorii fenomenelor imunologice mediate celulat, de *tip întîrziat* (limfocitele „T").

Aceşti factori pot media apariţia de fenomene ce au o consecinţă diametral opusă pentru organismul în care se produc, şi anume:

— *reacţia specifică de apărare*, de vindecare, intră în categoria reacţiilor de imunitate antiinfecţioasă, antitoxică.

— *reacţii nocive*, de boală, numite de *sensibilizare* (hipersensibilizare), reacţii alergice ca şi reacţiile de rejecţie a homografelor. Oricare din aceste fenomene poate fi de tip imediat (umoral) sau de tip întîrziat (celular) sau mixt, în raport cu efectorii implicaţi. Din această alternativă, conceptul actual asupra *răspunsului imun* diferă de cel iniţial, limitat la efectul de apărare declanşat prin contactul organismului cu un agent infecţios. În prezent accentul cade pe natura mecanismului, incluzînd ca efect atît apărarea cît şi patologia imună.

2.2.1. POSIBILITĂŢILE DE REACŢIE SPECIFICĂ ŞI NESPECIFICĂ

Posibilităţile de reacţie specifică şi nespecifică ale organismelor superioare faţă de agresiuni sînt schematizate în fig. XXI.2. Procesul imunologic are ca punct de plecare aşa-numita *recunoaştere a propriului* (self) de străin (non self); acesta este un caracter fundamental la care se pot adăuga: specificitatea, „memoria imunologică", suspendarea memoriei sau toleranţa imunologică. În anumite condiţii reacţiile imune se petrec şi faţă de substanţele proprii, degradate, care devin „non self" sau cînd componentul în cauză nu a fost de timpuriu cunoscut în sistemul imun respectiv.

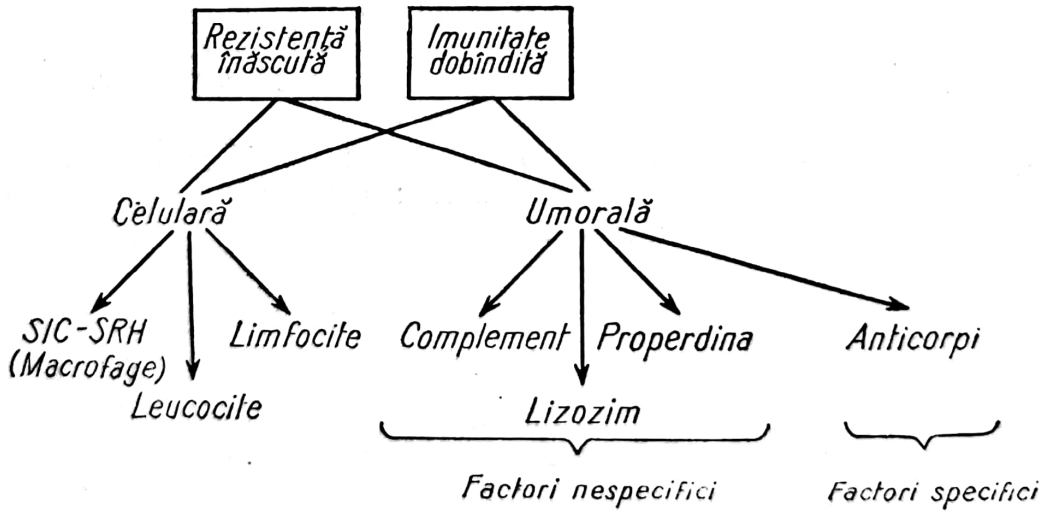


Fig. XXI.2. Cele două modalităţi reacţionale de apărare ale organismului (adaptat după Rapoport).

2.3. SISTEMUL IMUN

Acesta este un organ difuz, răspîndit în majoritatea ţesuturilor. El cuprinde: un trilion de celule (10^{12}) imunocompetente din SRE (SIC) leucocitele, limfocitele şi derivatele lor plasmatice, precum şi 100 de milioane de

Scanned with OKEN Scanner

trilioane (10^{20}) macromolecule, adică anticorpii sintetizaţi şi liberaţi în circulaţie de către limfocite şi plasmocite. Limfocitele din curentul sanguin reprezintă doar o mică parte din totalul populaţiei limfocitare, 99% fiind în organele de producţie, ganglioni limfatici, măduvă, timus, splină.

2.3.1. LIMFOCITE „T" ŞI „B"

Concepţiile actuale asupra răspunsului imun recunosc, ca fundamentale pentru asigurarea lui, existenţa a *două populaţii de limfocite*, denumite „T" — timodependente şi „B" — bursodependente*; denumirea este legată de proveniența lor din anumite organe limfoide centrale: timusul pentru limfocitele „T" şi măduva osoasă (echivalent probabil al bursei Fabricius de la păsări) pentru limfocitele „B".

Tabelul XXI.1

Proprietăţile limfocitelor T şi B

Proprietăţi	Limfocite T	Limfocite B
1. *Morfologice:*	Sfere cu suprafaţa netedă, foarte puţini vili	Suprafaţa acoperită de numeroşi vili
2. *Locul de formare:*	Măduva osoasă	Măduva osoasă
3. *Locul de diferenţiere:*	Timus	Ganglioni limfatici, splină, alte ţesuturi limfoide
4. *Durata vieţii:*	Luni — ani	Zile — săptămîni
5. *Felul răspunsului imun:*	Celular	Umoral (anticorpi circulanţi)
6. *Funcţia:*	Specific sensibilizate, anticorpi celulari, eliberare de mediatori chimici, rejecţie de grefă	Producţia de anticorpi umorali
7. *Intrare în acţiune:*	Întîrziat	Imediat

În diferenţierea limfocitelor „T" şi „B" din celulele de origine intervin hormoni specifici ca: timopectina (hormon polipeptidic timic) şi ubicuitina (hormon polipeptidic izolat din toate ţesuturile). Mecanismul biochimic de reglare a procesului este de tipul „sistemului cu două semnale", care implică AMP-ciclic ca semnal secund. În tabelul XXI.1 sînt redate proprietăţile limfocitelor „T" şi „B". Cele două tipuri de limfocite produse în organele centrale sînt trimise pe cale circulatorie către organele limfoide periferice (ganglioni limfatici, splină, ţesuturi limfoide asociate, tractusul intestinal, plăci Payer, apendice, plăci lăptoase din omentum majus). La acest nivel contactul lor cu antigenul declanşează răspunsul imunoefector.

2.3.1.1. *Limfocitele T*, cu suprafaţă aproape netedă, răspund de imunitatea mediată celular, hipersensibilitatea întîrziată sau de tip tuberculinic, distrugerea celulelor „ţintă" — funcţie de „Killer", activitatea „Helper" — de ajutor în fenomenul de producere a anticorpilor, rejecţia transplantelor. Viaţa lor este de ordinul lunilor şi chiar mai mult (un an).

În imunitatea mediată celular, limfocitele „T" specific sensibilizate reprezintă anticorpii celulari ce posedă pe suprafaţă sedii de recunoaştere a antigenului. În răspunsul imun de tip primar limfocitele „T" cu memorie

* Echivalenţa măduvei cu bursa Fabricius nu este riguros definită.

Scanned with OKEN Scanner

imunologică persistă 4—5 zile. Răspunsul imun secundar se caracterizează prin mobilizarea rapidă a limfocitelor „T" la locul de pătrundere a antigenelor. Contactul lor cu antigenul este urmat de transformare blastică, proliferare rapidă de L.S.S. și eliberare de diferiți mediatori chimici moleculari de natură necunoscută denumiți limfokine (factori de inhibare a migrării macrofagelor, „factori de transfer", factor mitotic, limfotoxine sau factorul citotoxic).

2.3.1.2. *Limfocitele „B"*, cu numeroși vili pe suprafață stimulate prin antigene dau naștere plasmocitelor generatoare de *imunoglobuline* (anticorpi umorali). În răspunsul imun față de diferite antigene, limfocitele „B" au nevoie de acțiunea „Helper" a limfocitelor „T" pentru a putea produce anticorpi. Feldman (1972) sugerează un circuit fiziologic al antigenului referitor la angajarea lui în procesul generator de anticorpi.

2.3.2. ETAPE CELULARE ALE RĂSPUNSULUI IMUN

Recunoașterea antigenului la nivelul celulelor imunocomponente este procesul preliminar obligatoriu, care precede răspunsul imun, independent de tipul acestuia, umoral sau celular. În prima etapă, antigenul se fixează pe suprafața limfocitului „T" ce poartă receptorii de suprafață specifici. În etapa următoare antigenul s-ar desprinde de pe celulele „T", păstrînd legat de el un fragment de membrană celulară, care va media legarea antigenului la suprafața macrofagului. Pentru ca antigenul să poată declanșa răspunsul imun, el trebuie să fie preluat și degradat de către macrofage și apoi transferat limfocitelor. Dintre ipotezele referitoare la modalitățile acestui transfer „in vivo" pot fi amintite cîteva mai importante. ARN imunogen din macrofag, difuzat în circulația sanguină și limfatică, s-ar fixa la nivelul celu-

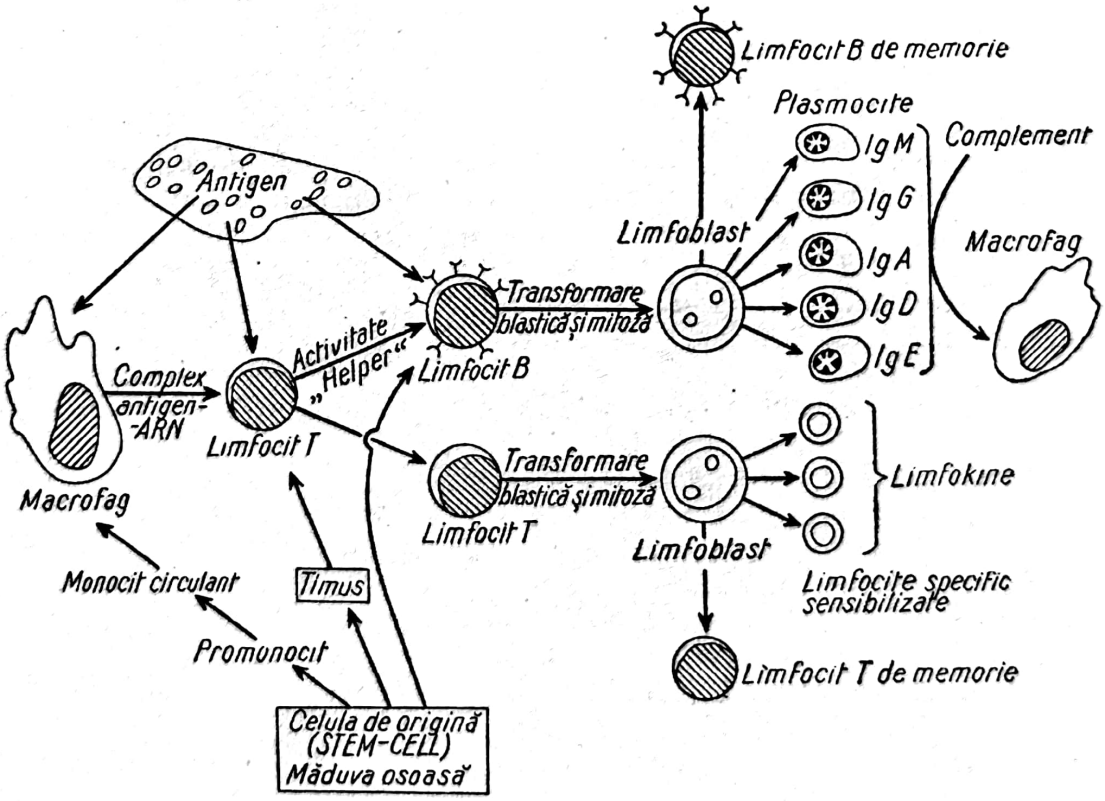


Fig. XXI.3. Etapele celulare ale răspunsului imun.

lelor producătoare de anticorpi. Ar exista un schimb intercelular în urma contactului direct dintre macrofage şi limfocite. Nassal (1965) scoate în evidenţă rolul unei categorii speciale de macrofage denumite „dentritice"; aceste macrofage ar emite dendritele după captarea antigenului. Acestea ar intra în contact cu limfocitele grupate la periferia centrilor germinativi, din ganglionii limfatici. După captarea şi degradarea antigenului de către macrofag, ARN imunogen legat de restul antigenului ar fi transferat direct, de la macrofag la limfocit, pe cale dentritică. Etapele celulare ale răspunsului imun sînt redate în modelul din fig. XXI.3. Se cunosc şi alte modele mai noi ale acestor interrelaţii celulare, implicate în răspunsul imun, ce vor fi prezentate în cadrul datelor referitoare la receptorii celulari de suprafaţă ai limfocitelor „T" şi „B" şi ai macrofagelor.

Se expun mai departe cunoştinţele de biochimie, care au adus un aport substanţial la elucidarea problemei *răspunsului imun la nivel molecular*, fără să fi dat însă soluţionarea sa completă. Ne vom opri deci asupra datelor referitoare la: *compoziţia şi structura antigenelor şi anticorpilor, sinteza şi genetica anticorpilor*, receptorii de suprafaţă ai celulelor imunocompetente, recunoaşterea antigenului, reacţia antigen-anticorp.

3. ANTIGENELE

3.1. DETERMINANŢI ANTIGENICI

Antigen poate fi orice substanţă care introdusă în organism declanşează reacţii imunologice. Răspunsul imunitar poate ţine de formarea de anticorpi circulanţi (umorali) sau de starea de sensibilitate celulară sau hipersensibilitatea întîrziată, stare refractară sau de toleranţa imunologică, cu pierderea „memoriei imunologice". Natura antigenelor este foarte variată ca origine şi structură, ele putînd să fie: proteine, polizaharide, lipide sau asociaţii dintre acestea. Antigenele se pot produce direct în organism prin modificări metabolice neobişnuite, mutaţii somatice sau transformări oncogene (Burnet, 1970). În funcţie de provenienţa lor în raport cu specia animală imunizată, antigenele pot fi clasificate în: *heteroantigene* (de origine străină, de la altă specie animală, vegetală sau microbiană); *izoantigene* provenite de la un grup de indivizi din cadrul aceleiaşi specii (ca antigenele de grup sanguin); *autoantigenele* sau substanţe antigenice produse în organismul propriu.

Secvenţele de grupări chimice care conduc la realizarea efectului imunitar alcătuiesc ceea ce se numeşte un *determinant antigenic* sau *epitop*.

Pe lîngă antigenele complete mai trebuie precizată noţiunea de haptene sau *antigene incomplete*. Acestea sînt substanţe specifice care reacţionează cu anticorpii omologi, dar nu generează anticorpi.

3.2. ANTIGENELE COMPLETE*

Acestea au două caracteristici fundamentale: *antigenitatea* şi *specificitatea*.

Antigenitatea este capacitatea unei substanţe sau a unui component de a induce producerea de anticorpi sau sensibilizarea celulară.

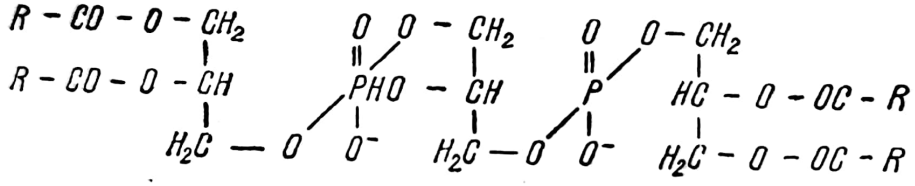
---

* Istoricul cunoştinţelor dobîndite asupra antigenelor începe cu lucrările lui Behring şi Kitasato (1890), dezvoltîndu-se prin rezultatele obţinute de Pfeiffer, Bordet (1895).

Scanned with OKEN Scanner

Specificitatea este capacitatea unei substanţe de a reacţiona cu un anumit anticorp, într-un mod complementar.

Cele mai bune antigene sînt proteinele şi proteinele conjugate cu polizaharide. În cazul complexului proteină-polizaharid, *specificitatea antigenică majoră* este determinată de polizaharide. Capacitatea de a *induce apariţia de anticorpi* este datorată *componentei proteice*. Majoritatea proteinelor sînt antigene, spre deosebire de polipeptide şi histome, care manifestă rareori această proprietate. Baza moleculară a variabilităţii imunogene a diferitelor proteine nu este însă bine cunoscută. Se presupune că ea ar putea fi explicată, prin diferenţele de structură — primară, secundară, terţiară, cuaternară — a diferitelor proteine. Polizaharidele au o putere imunogenă mai slabă decît proteinele. Atît polizaharidele, cît şi cele ramificate pot determina însă reacţii de specificitate în cadrul răspunsului. Antigenitatea acizilor nucleici este discutabilă şi controversată încă. În lupusul eritematos diseminat ADN ar funcţiona ca antigen. Lipidele sînt socotite a fi lipsite de capacitatea antigenică. Se cunosc însă antigene active de origine tisulară, a căror specificitate depinde de factorii lipidici ca de ex. cardiolipina sau haptena Wasserman.



Cardiolipina (difosfatidilglicerina)

Aceasta are proprietăţi haptenice; cuplate cu unele proteine poate induce producerea de anticorpi ce se comportă ca „reagine-Wasserman", existente în serurile luetice.

În unele stări patologice apar în circulaţie „antigene de organ" (cristalin, rinichi, tiroidă, ţesut nervos, testicul) care generează autoanticorpi cu implicaţii în determinismul proceselor morbide prin mecanism auto-imun.

Trebuie subliniat faptul că antigenele prezintă o *specificitate de specie*, strîns corelată cu clasificarea biologică, precum şi o specificitate *de organ*. Aceste trăsături exprimă variabilitatea de compoziţie şi structură a proteinelor sintetizate în diferitele condiţii biologice ale evoluţiei şi diferenţierii celulare. Trebuie menţionat însă şi faptul că o serie de macromolecule provenind de la specii diferite, dar care au structuri chimice similare (hormoni, enzime, izoenzime) şi proprietăţi funcţionale identice, reacţionează serologic încrucişat. *„Despecifizarea"* proteinelor plasmatice ar da posibilitatea — în scop terapeutic — înlocuirii proteinelor umane cu cele de origine animală.

Iată acum care sînt condiţiile pe care o substanţă trebuie să le îndeplinească pentru a fi un antigen specific.

3.2.1. CONDIŢII DE ANTIGENITATE

a) *structură chimică diferită* de aceea a substanţelor similare din organismul receptor;

b) *grad ridicat de complexitate* structurală şi dimensiune moleculară mare (Landsteiner); substanţe cu o greutate moleculară mică, ca de ex.

2-4-dinitrobenzenul capătă proprietăţi antigenice datorită capacităţii lor de a se combina cu anumite grupări reactive ale proteinelor tisulare;

c) prezenţa unor grupări chimice ce conferă moleculei un *grad ridicat de stabilitate structurală, o configuraţie fixă,* care să poată determina o replică de structură complementară (proteină-anticorp) la nivelul sistemului imunocompetent, limfoplasmocitar. Haurovitz (1952) arată că ciclurile benzenice, din compuşii aromatici diazoici asigură această rigiditate necesară răspunsului anticorpic, în timp ce lanţurile parafinice defavorizează antigenitatea fiind supuse distorsiunilor. Unii polimeri sintetici ca polialanina sau polilizina, imunogenic inactivi, devin activi dacă li se adaugă un amino acid aromatic (tirozina, fenil alanina, histidina). Deşi aromaticitatea este favorabilă proprietăţilor antigenice, ea nu este totuşi indispensabilă apariţiei lor. Alte modificări chimice ca nitrarea sau arsanilizarea unei substanţe proteice cu structură simplă (ca de ex. gelatina) poate determina apariţia capacităţii de a produce anticorpi.

d) substanţa să fie străină de organismul în care pătrunde;

e) să provină dintr-o sursă taxonomic îndepărtată de animalul receptor, situaţie ce poate asigura o diferenţă structurală marcată faţă de cele omoloage din organismul gazdă.

Antigenitatea poate fi tulburată prin denaturarea substanţei purtătoare a acestei funcţii. *Racemizarea* unei proteine (prin tratare cu alcalini) precedată de fracţionarea moleculei (Boyd) conduce la scăderea calităţii antigenice.

3.2.2. CONDIŢII DE SPECIFICITATE

Acestea sînt hotărîte prin:

a) *structura chimică a moleculei de antigen;*

b) *natura chimică şi orientarea spaţială,* cu poziţia relativă a grupărilor active, libere în molecula antigenică;

c) *secvenţa elementelor* componente ale moleculei polimerului (a aminoacizilor în cazul proteinelor);

d) *gradul şi modul de torsionare a polimerului.*

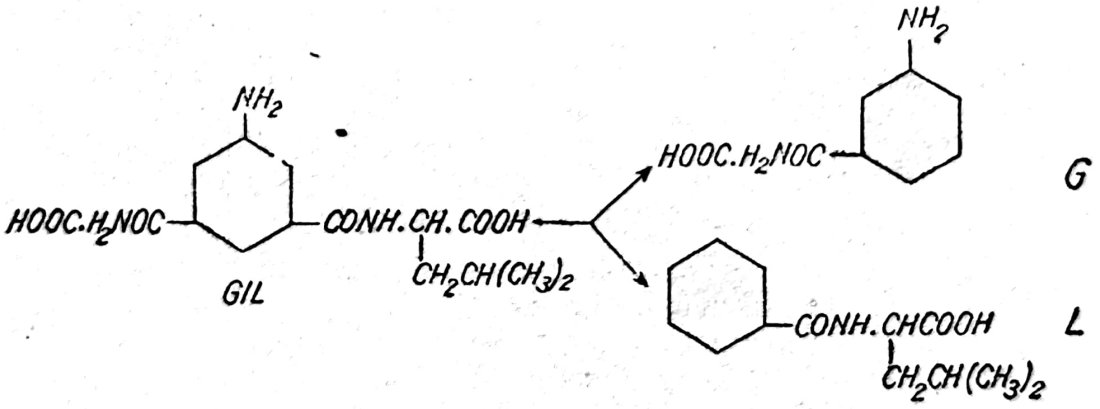
Revenind cu precizări asupra acestor patru condiţii trebuie subliniat aportul important al lucrărilor de imunochimie efectuate în perioada 1906—1945 pentru stabilirea substratului molecular al specificităţii antigenice. În 1906 Obermayer şi Pick au dovedit că o simplă modificare în structura unei proteine — introducerea unei grupări NO_2 (nitrare) sau a unui atom de iod (halogenare) poate determina schimbarea specificităţii antigenice. Datorită lucrărilor lui Landsteiner şi colab. 1945 s-a demonstrat că această schimbare se poate obţine şi prin alte procedee ca: esterificarea, metilarea sau acetilarea, prin care se blochează grupările funcţionale de suprafaţă — carboxil, hidroxil, amino — din aminoacizii ce intră în compoziţia lanţurilor polipeptidice antigenice. În lucrările lui Landsteiner diazoreacţia are o poziţie centrală pentru determinarea modificărilor de specificitate antigenică. Prin diazotarea unor proteine (globuline) de origine diferită s-a provocat formarea de azoproteine, ce dau reacţii încrucişate (determinanţi antigenici comuni) cu antiserurile respective. De asemenea, prin tratarea proteinelor cu fenil izocianat în soluţie alcalină s-au obţinut fenil-ureidoproteine ce dau reacţii

Scanned with OKEN Scanner

încrucişate ale unor proteine de origine diferită. S-a demonstrat astfel că specificitatea antigenică depinde de grupări chimice funcţionale ce au o anumită structură.

e) O altă categorie de investigaţii a dovedit *rolul izomeriei optice*, a caracterelor stereochimice ale moleculelor antigenice, în determinismul specificităţii sale imunologice. S-au folosit în acest scop antigene dextro, levo şi mezotartrice, precum şi antigene glucozidice şi galactozidice. S-a ajuns la concluzia că specificitatea antigenică poate fi modificată prin rearanjarea diferită a unei grupări chimice în jurul unui singur atom de carbon, aşa încît ea să ocupe poziţiile dextro, levo sau mezo.

f) *Izomeria de poziţie* s-a dovedit a avea, ca şi cea optică, un rol în determinismul specificităţii antigenice. Avînd ca punct de plecare proteine neînrudite antigenic s-au folosit în studii bazate pe reacţii de precipitare cu seruri imune monospecifice, azoderivaţi substituiţi cu aceeaşi grupare (de ex. SO_3H, COOH) în poziţiile orto, meta şi para. S-a demonstrat importanţa poziţiei relative a grupărilor funcţionale libere, din molecula antigenică, pentru determinismul specificităţii antigenice. S-au folosit în experimente azoproteine sintetizate din dipeptide ca: glicil-glicina, leucil-leucina, glicil-leucina, leucil-glicina. Observaţiile au arătat că aminoacidul C-terminal influenţează specificitatea antigenului. Din studii în continuare, efectuate cu pentapeptide, rezultate din diferite combinaţii de leucină şi glicină, s-a dedus că specificitatea antigenică poate fi modificată în măsură diferită de toţi cei cinci aminoacizi terminali. Imunizarea obţinută prin folosirea unui compus similar de tipul amino-izoftalil-glicin leucina (GIL) a condus la formarea a două tipuri de anticorpi (G şi L) şi la concluzia că pot exista compuşi de tipul celui experimentat ce constituie un determinant dublu antigenic, sau antigen bivalent.



Structura chimică a compusului sintetic GIL (amino-izoftalilglicin-leucina)

Conform ipotezei lui Marrak caracterele imunologice ale proteinelor naturale sînt determinate de secvenţa aminoacizilor în lanţul polipeptidic (structura primară). Forma globulară a proteinelor (globulinele) anihilează acţiunea unora dintre aminoacizii care nu mai au acces la suprafaţa moleculei. Mai multe resturi aminoacidice, învecinate, pot reacţiona în ansamblu, constituind „un centru activ" (determinat pe suprafaţa antigenului=active patch). Suprafaţa unui centru activ ar fi după Landsteiner şi Van der Scheer (1938) de 7 μ^2 iar după Karush (1956—1957) de 6—8 μ^2.

Scanned with OKEN Scanner

Studiul antigenelor de tip poliozidic (1971) a dovedit că situsurile specifice ale antigenelor pot fi reprezentate chiar numai printr-un trizaharid ca: manoza—ramnoza—galactoza. Una din cele trei molecule de zahăr simplu este *imunodominantă*, deoarece anticorpii vor reacţiona în special cu zaharurile imunodominante, situate de obicei la extremitatea lanţului poliozidic, la salmonelle, iar la pneumococ în interiorul lanţului liniar.

3.2.3. VALENŢA ANTIGENELOR

Este exprimată în numărul de molecule de anticorpi ce reacţionează cu o singură moleculă de antigen. Numărul acestor valenţe este în funcţie de acela al determinanţilor antigenici ai unei molecule, care în general, nu sînt bine cunoscuţi. Cu toate deficienţele *neînlăturate*, pînă în prezent numărul valenţelor poate fi stabilit estimativ, prin *două feluri de metode serologice* — prin analiza precipitatelor — pentru antigenele naturale (proteine, polizaharide bacteriene) sau *chimice* — prin titrare — pentru antigenele sintetice. S-au semnalat diferenţe între numărul de valenţe stabilit prin cele două tipuri de metode. Diferenţa este datorită faptului că unele grupări chimice active nu sînt accesibile anticorpilor, nefiind aşezate la suprafaţa moleculei, dar sînt abordabile reacţii chimice. Pentru antigenele cu greutate moleculară medie s-a calculat că numărul minim de grupuri reactive, în precipitarea complexului antigen-anticorp este cuprins între 5—15.

4. HAPTENE* (ANTIGENE INCOMPLETE SAU PARŢIALE)

Aşa cum s-a arătat anterior, au fost denumite haptene unele substanţe simple cu dimensiuni moleculare variate (în special mici), legate foarte probabil covalent Mitchison (1967) şi Hamaoka şi colab. (1971) de o proteină suport. Ele pot reacţiona specific cu anticorpii dar nu pot induce producerea lor. În accepţia iniţială dată de Landsteiner, aceste antigene parţiale erau substanţe cu greutate moleculară mică ca: acizii aminobenzoici, arsanilaţi, bipeptide, pentapeptide, acid acetil-salicilic. Ulterior aceeaşi şcoală a folosit antigene sintetice cu dimensiuni moleculare variate ca: derivatul anilinic al acidului succinic (greutate moleculară mică), derivatul anilinic al acidului adipic (cu greutate moleculară mijlocie), derivatul anilinic al acidului suberic (cu lanţ lung de atomi de carbon, greutate moleculară mare).

Serurile imune obţinute au dat reacţii de precipitare cu antigenul omolog iar haptena cu greutatea moleculară cea mai mare, derivată din acid suberic, precipită cu serul omolog, chiar în absenţa proteinei suport. Alte cercetări au dovedit că o serie de compuşi cu structură complexă şi greutate moleculară mare (polizaharide bacteriene, polipeptide de tip PPD, tuberculofosfatidul) posedă proprietăţi haptenice.

Avînd în vedere gradul de complexitate a substanţelor cît şi modul lor de comportare, haptenele au fost clasificate fie în *simple*, care in vitro nu formează precipitate, iar in vivo nu produc anticorpi, fie haptene *complexe*, care precipită in vitro cu serul omolog, iar in vivo nu produc anticorpi. În altă clasificare se vorbeşte de haptene *precipitante* ce corespund celor complexe

* Etimologic, cuvîntul haptenă derivă din verbul grecesc „haptein" = a apuca.

Scanned with OKEN Scanner

și haptene *inhibitorii*, neprecipitante, corespunzătoare celor simple, care pot reacționa cu anticorpii omologi, pe care îi blochează fără a produce precipitate in vitro. Anticorpul devine astfel inactiv pentru determinanții antigenici ai antigenului complet sau ai haptenei precipitante.

5. TIPURI DE ANTIGENE CU IMPORTANȚĂ BIOLOGICO-MEDICALĂ

5.1. VIRUSURILE CU STRUCTURĂ MACROMOLECULARĂ NUCLEOPROTEICĂ

Acestea sînt reprezentate în special prin acizii nucleici virali (ARN-ADN), răspunzători de acțiunea infectantă. Aceștia sînt înconjurați de un înveliș proteic *Capsida* imunogenă. Învelișul precapsidal, la rîndul său, are o compoziție mixtă lipido-glucido-proteică asemănătoare cu aceea a membranelor celulei gazdă. Antigenitatea virală este determinată de ultimele două componente structurale virale, capsida și învelișul pericapsidic.

5.2. ANTIGENELE BACTERIENE

Structura chimică a pereților bacterieni (1/5 din masa uscată a bacteriei) condiționează în mare măsură proprietățile imunologice ale microorganismelor respective. Se cunosc destul de bine *bazele moleculare* ale diferenței dintre bacteriile Gram$^+$ și Gram$^-$, din punct de vedere al compoziției peretelui. La grupul Gramm$^+$ (coci, bacili) acesta este alcătuit preponderent din mucopolizaharide (MPZ), cîțiva aminoacizi înlănțuiți în legături peptidice și foarte puține lipide (fig. XXI.4). Peretele bacterian al grupului Gramm$^-$ (Salmonelle, Shigele, E. Coli) este caracterizat prin conținut ridicat de lipoproteine în care sînt reprezentați toți cei 22 aminoacizi și din lipopolizaharide. Comparativ cu prima categorie (Gram$^+$), bacteriile Gram$^-$ conțin de zece ori mai multe lipide dar numai 1/10 aminoglucide. După cercetările lui Weidel s-a dedus că există un schelet de bază al peretelui bacterian, mureina, care înconjură conținutul celulei. Componentele esențiale ale mureinei sînt: ami-

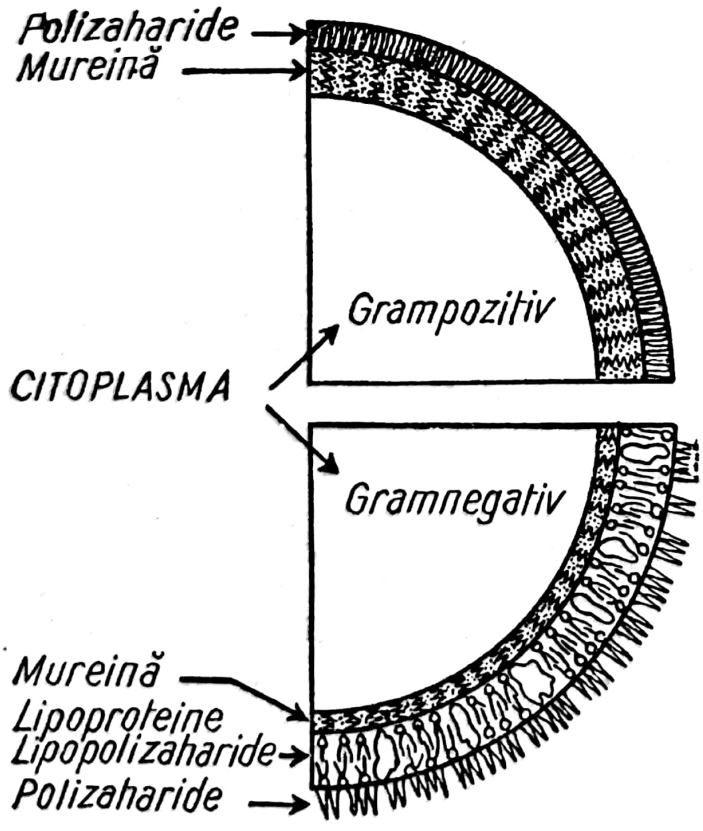
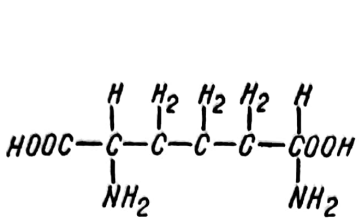


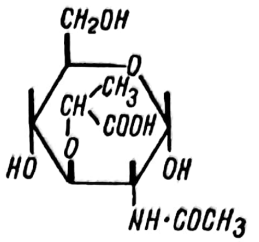
Fig. XXI.4. Structura moleculară a peretelui bacterian:
a) germeni Gram (+); b) germeni Gram (—) (adaptat după Rapoport).

Scanned with OKEN Scanner

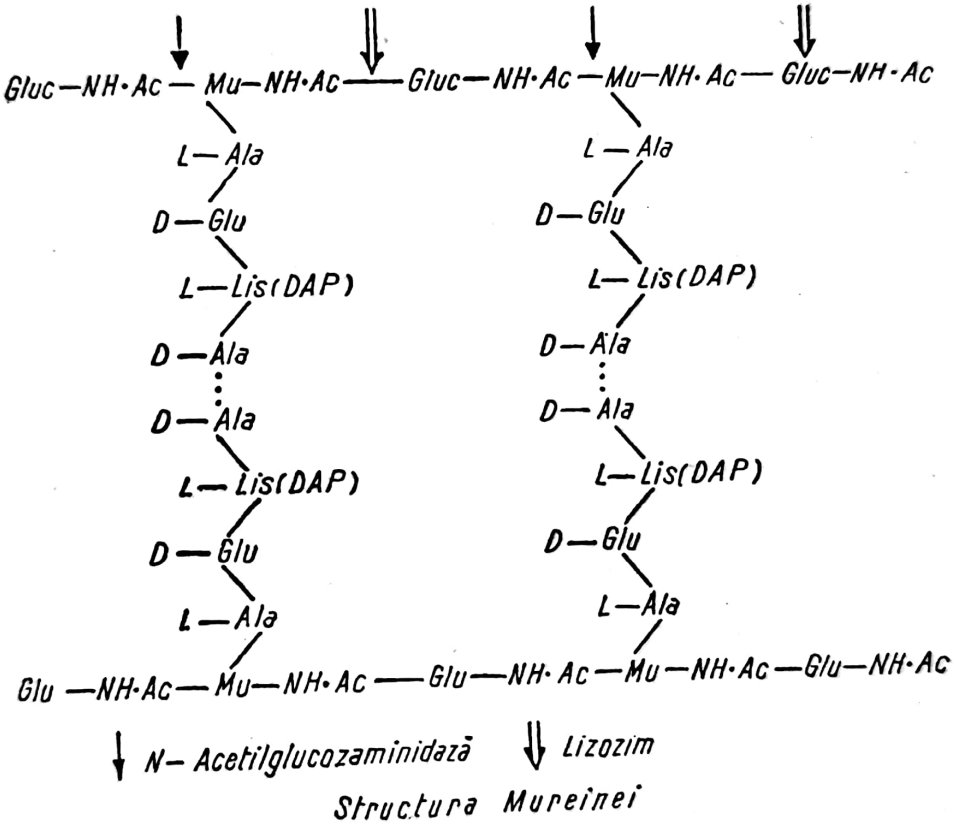
noacizii — alanină, glutamat, lizină, acid diaminopimelic (DAP), acetil glucozamina şi acidul acetilmuraminic.



Acid diaminopimelic (DAP)



Acid N-acetilmuraminic



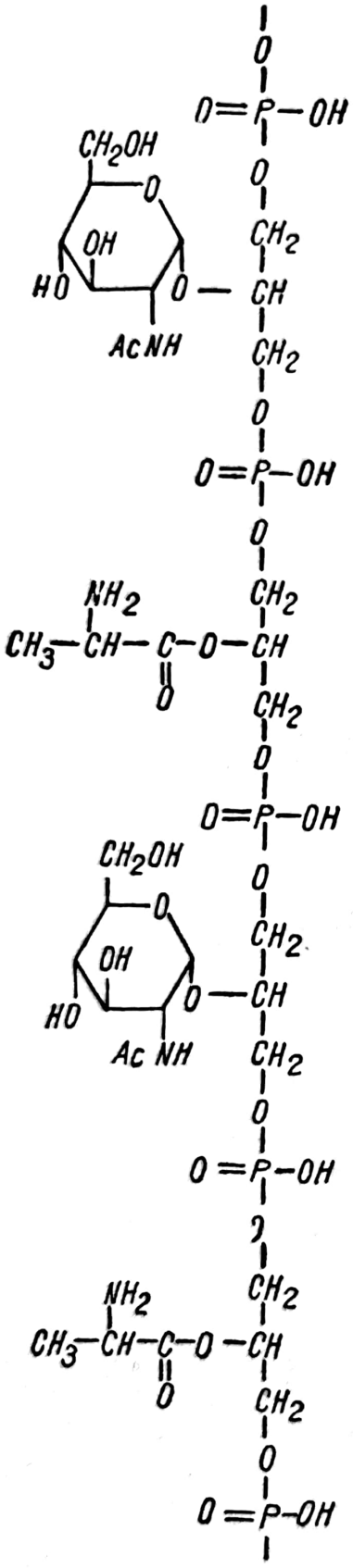
Structura Mureinei

La bacteriile Gram$^+$ s-au mai găsit printre componente polimeri de esteri fosforici — acidul teicoic, precum şi polimeri de glicină, care condiţionează rigiditatea scheletului mureinic. Sinteza acidului acetilmuraminic se realizează printr-o reacţie între UDP (uridindifosfat)-acetilglucozamină şi fosfoenolpiruvat, urmată de hidrogenare:

$$\text{UDP-Gluc-Nh-Ac} + \text{Pir} \sim \text{P} \rightarrow \text{UDP-GLUC-NH-Ac-Pir} + \text{P}$$

$$\text{UDP-Glc-NH-Ac-Pir} \xrightarrow{+H_2} \text{UDP-Glc-NH-Ac-Lactat}$$

Proprietăţile antigenice ale peretelui bacterian au la bază compoziţia structurii sale externe. S-au obţinut date interesante privind în special antigenitatea şi compoziţia peretelui celular al bacteriilor Gram$^-$. Formele S



Segment al acidului teicoic

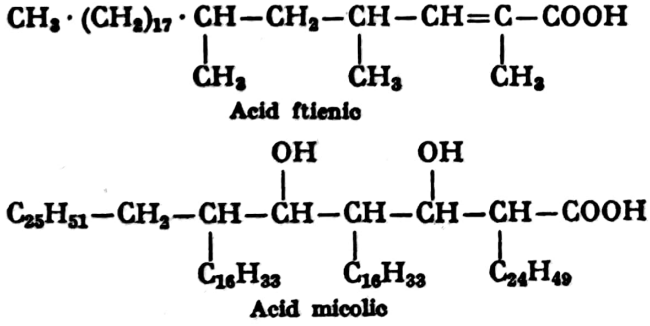
(smooth) posedă toate felurile de antigeni, inclusiv antigenul O, acesta din urmă lipsește în formele R (rough). Se cunosc mutanți cărora le lipsesc mulți antigeni (mutant M și super R).

Lipozaharidele din peretele celular constau în principal din trei regiuni cu straturi diferite. Printre acestea se găsește lipopolizaharidul — lipoid A*. Lipoidul A este și purtătorul acțiunii endotoxice a bacteriilor Gram⁻. În stratul cel mai din afară se găsește un polizaharid din galactoză, manoză și ramnoză, care determină proprietățile antigenice O.

Cercetările asupra polizaharidelor (proteoglicanilor) au dovedit că aceiași determinanți antigenici se pot găsi în produse naturale de sursă diferită ca de ex. în anumite spițe de pneumococ, în mucoasa gastrică și în antigenele de grup sanguin.

5.3. BACILII KOCH

Ei au membrana preponderent alcătuită din lipide (trigliceride, fosfatide, ceride); conțin acizi grași ramificați, saturați sau nesaturați, esteri și trehaloză, a căror componentă acidă la tulpinele virulente constă din acid ftienic și acid micolic.



Acid ftienic

Acid micolic

Virulența bacteriilor TBC este declanșată principal prin așa-numitul „cord factor", ester al trehalozei cu acidul micolic. Trebuie subliniat faptul că folosind fracțiunea lipidică a bacteriilor TBC se pot obține imunizări comparabile cu cele obținute prin BCG.

5.4. TOXINELE BACTERIENE

Acestea sînt o categorie de antigene ce iau naștere în metabolismul anumitor specii microbiene. Ele pot fi împărțite pe criteriu de

* Acesta conține glucozaminofosfat, ca dizaharid ale cărui grupări OH se esterifică cu diferiți acizi grași. O altă componentă este acidul 2-ceto-3 dezoxioctanic.

Scanned with OKEN Scanner

apartenenţă, în două mari categorii: (a) cele secretate de germenii Gram$^+$, cu caracter de exotoxine ce pot fi izolate din mediul de cultură avînd constituţie proteică; ele sînt termolabile şi detoxifiabile prin formaol; (b) toxinele secretate de bacteriile Gram$^-$ au caracter de endotoxine ce pot fi izolate din corpul bacterian, au compoziţie macromoleculară complexă, alcătuită din fosfolipide, proteine, polizaharide. Sînt termostabile şi nedetoxifiabile prin formol. Din prima categorie fac parte toxina difterică, toxinele streptococice. Date de biochimie destul de numeroase se cunosc referitor la cele două categorii de toxine şi la rolul ozidelor, poliozidelor, al proteinelor şi lipoproteinelor în constituţia şi funcţia acestora.

5.5. ANTIGENE CELULARE ŞI TISULARE

5.5.1. ANTIGENELE HETEROFILE SAU ANTIGENELE FORSSMAN

Noţiunea datează din 1911 cînd Forssman dovedeşte capacitatea unor antigene din organele de cobai (rinichi) de a induce hemolizine contra eritrocitelor de oaie, ceea ce la modul general înseamnă inducţia de anticorpi faţă de antigene de la specii heteroloage. Asemenea antigene heterofile se găsesc în organele unui număr mare de specii de animale diferite şi sînt similare cu cele ce se găsesc la o serie de bacterii (ca bacilul dizenteric Shiga, unele Salmonelle, Pneumococi) şi cu substanţă specifică de grup sanguin. Landsteiner a arătat că haptenele antigenelor heterofile au structură mucopolizaharidică.

5.5.2. ANTIGENELE SPECIFICE DE GRUP SANGUIN

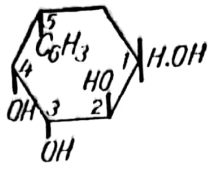
Antigenele eritrocitare de suprafaţă induc apariţia de anticorpi serici care determină aglutinarea eritrocitelor (izoaglutinine). Ele aparţin grupului de antigene heterofile. La om se cunosc 14 sisteme de grup sanguin, care constau din mai bine de 100 antigene. Pe lîngă grupele sanguine AB0 descoperite de Landsteiner în 1901, cu subgrupele respective —A_1, A_2, H etc. — au fost descrise şi alte antigene eritrocitare —Rh (Rhesus), P, sistemele MNS, Kell-Celano, Lewis, Lutheran etc. În serul purtătorilor de antigene de grup sanguin — A, B sau AB — sînt prezente izoaglutininele anti B (beta), anti A (alfa), sau acestea lipsesc total la AB. La cei cu grupa 0 se găsesc în ser anticorpi anti A anti B. Grupele eritrocitare (0) poartă pe suprafaţă antigenul H. În Europa Centrală distribuţia procentuală a grupelor sanguine este: grupa A 40%, avînd în ser izoglutinina beta; grupa B (16%) cu izoaglutinina alfa în ser; grupa AB (4%) fără izoaglutinine în ser; grupa (0) cu antigen H eritrocitar şi izoaglutininele α şi β în ser. Sînt desemnate ca persoane secretoare (cca 80% din populaţie) acelea care elimină substanţe de grup sanguin, solubile în apă, prin: urină, salivă, suc gastric, lichid amniotic, mucus cervical, lichid spermatic, lichid de chist ovarian etc.

5.5.2.1. *Caracterizare biochimică.* Datele biochimice pentru caracterizarea grupărilor sanguine sînt incomplete şi mult mai puţine decît cele serologice şi genetice. Părerile sînt unanime numai asupra naturii chimice a determinanţilor antigenici AB, 0 şi ai sistemului Lewis. Asupra celorlalţi determinanţi antigenici şi mai ales asupra sistemului Rhesus (important pentru geneza eritroblastozei fetale) nu este nimic cunoscut. Antigenele AB—H ce se găsesc (după cum am arătat) pe suprafaţa tuturor endoteliilor a multor celule epiteliale ca şi pe eritrocite, trombocite şi spermatozoizi sînt alcătuite mai mult din glicosfingolipide.

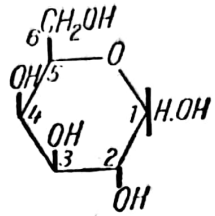
Scanned with OKEN Scanner

Monozaharidele prezente în determinanţii antigenici ai substanţelor de grup sanguin sînt: L-fructoza, D-galactoza, N-acetil-D-galactozamină, N-acetil-D-glucozamină şi N-acetil-neuraminic (acid sialic) dintre care principale sînt primele patru:

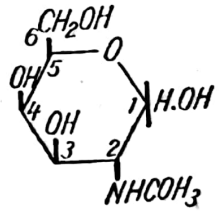
L - Fructoză



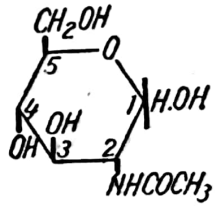
D - Galactoză



N-Acetil-D-Galactozamină



N-Acetil-D-Glucozamină



Datele asupra caracteristicilor chimice a antigenelor de grup sanguin, privesc atît molecula cît şi gruparea determinantă. Suportul transportor este o proteină sau un lipid în timp ce gruparea determinantă antigenic este formată de regulă dintr-un oligozaharid elaborat principal din patru componente (zaharuri).

Substanţele AB 0 şi Lewis secretate, cît şi antigenele eritrocitare de grup sanguin aparţin glicoproteinelor (proteoglicanilor).

Glicoproteina are o greutate moleculară de 200 000 pînă la mai multe milioane de daltoni, componenta glucidică reprezentînd 85% din greutatea totală. Conţinutul în serină şi treonină al compoziţiei proteice este remarcabil de ridicat. Se presupune că o parte din oligozaharid este legat glicozidic de grupările hidroxil ale acestor doi aminoacizi. Cu mare probabilitate, substanţa Rhesus aparţine componentelor glicolipidice. În acest caz molecula transportoare este ceramida, alcătuită dintr-un amino-alcool numit sfingol, antrenat într-o legătură amidică cu un acid gras. Această funcţie alcool primar este locul de legare a componentei oligozaharidice.

5.5.2.2. *Biosinteza* se realizează prin acţiunea enzimelor glicozil-transferaze. Monozaharidele sînt fixate pe o structură de bază, un schelet dizaharidic, alcătuit din D-galactoză şi N-acetil-D-galactozamină. Prin legarea celor două

Scanned with OKEN Scanner

zaharuri în formele 1-3-β-glicozidică sau 1-4-β-glicozidică, se obţin două tipuri de lanţuri, tipul 1 şi 2 În cayul că la structura bazală se leagă de galactoză (prin legătura α-glicozidică) un rest fucoză, prin acţiunea unei α-2-fucozil-

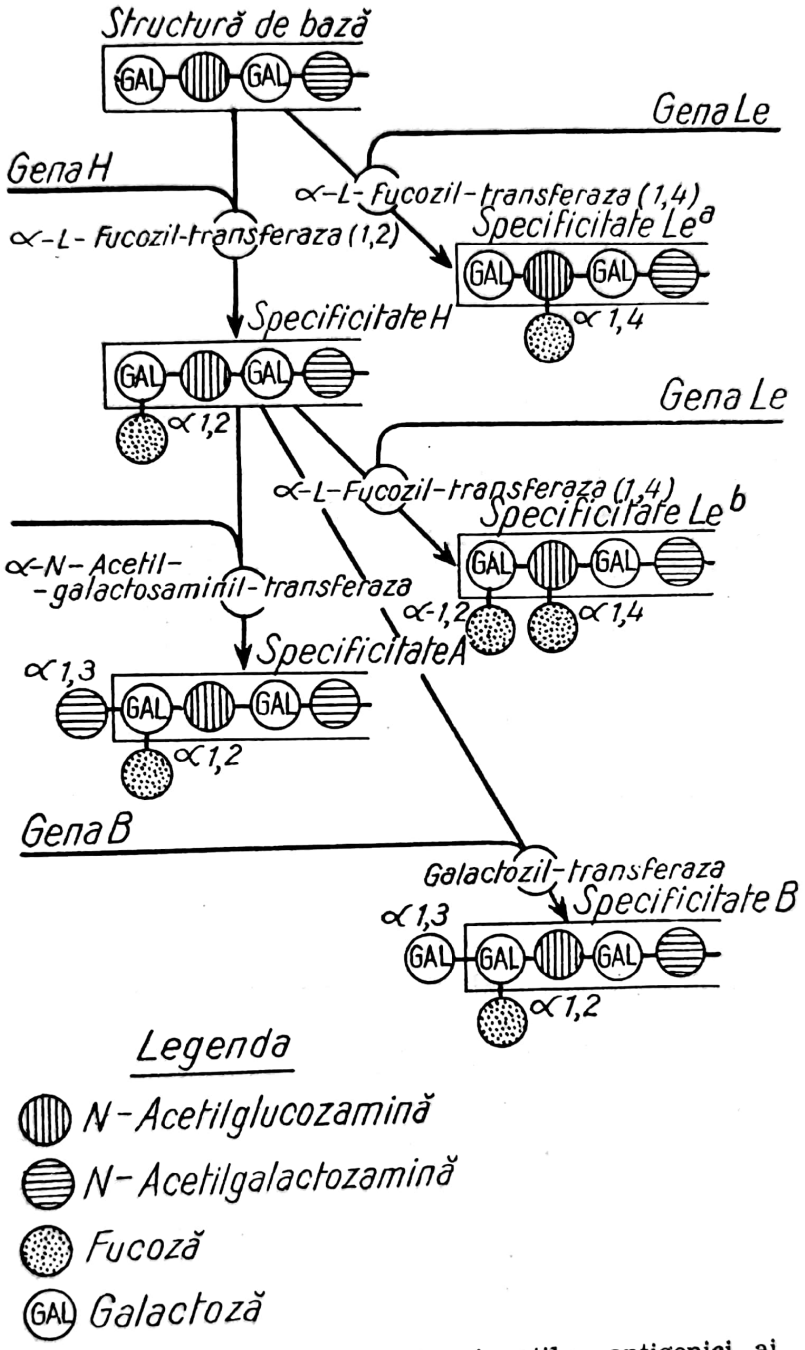


Fig. XXI.5. Biosinteza determinanţilor antigenici ai substanţelor de grup sanguin (după P. E. Petrides, M. Polonowski — modificat).

transferaze se produce o structură chimică cu specificitate H (eritrocite grup 0). Dacă această moleculă cu specificitate H se cuplează cu N-acetil-galactozamina, respectiv cu galactoza, se produc determinanţi antigenici ai

Scanned with OKEN Scanner

grupurilor A şi B. În aceste reacţii sînt implicate enzimele: α-N-acetil-galactozaminotransferaza şi α-galactozil-transferaza. În cazul că restul de fucoză este transferat numai pe componenta acetil-galactozaminică a structurii bazale, ia naştere o substanţă cu specificitate Le^a ($Lewis^a$). Dacă glucozil-transferaza acţionează asupra determinanţilor de grup H^+ ca substrat, ia naştere o substanţă antigenică tip Le^b. Pentru a se explica distribuţia grupurilor sanguine, au fost luate în consideraţie ipotetic două posibilităţi:

— toţi oamenii aparţin la origine grupului (0) — au substanţă antigenică H; prin mutaţie se cîştigă capacitatea de biosinteză a determinanţilor de grup sanguin A şi (sau) B;

— toţi oamenii posedă, la origine, determinanţii grupului A şi B şi printr-o mutaţie adaptativă pierd capacitatea de biosinteză a unuia din cei doi determinanţi de grup, producîndu-se grupa 0, cu antigenul H. În mod speculativ se atribuie epidemiilor de ciumă un rol în geneza acestei mutaţii.

5.5.3. ANTIGENELE LEUCOCITARE ŞI TROMBOCITARE

Aceste elemente figurate ale sîngelui sînt purtătoarele unui sistem de antigene, care în conformitate cu o convenţie internaţională unanim acceptată, este denumit sistemul HL—A (Human leucocyte locus A system). Aceste antigene sînt prezente în toate ţesuturile, cu excepţia eritrocitului şi reprezintă sistemul major de *histocomportabilitate la om*. El face parte dintr-o serie de „markeri genetici" a căror combinaţie duce la un număr mare de fenotipuri.

6. ANTICORPII SAU IMUNOGLOBULINELE

6.1. CONSIDERAŢII GENERALE

Anticorpii sînt molecule proteice responsabile de recunoaşterea antigenelor care le-au determinat producerea. Ei aparţin familiei heterogene specifice, denumite imunoglobuline.

Imunoglobulinele fac parte din sistemul gamaglobuline, dar nu toate gamaglobulinele sînt purtătoare ale funcţiei anticorp. Strînsul raport dintre acest atribut şi globulinele sistemului gama din plasma umană este dovedit şi prin incapacitatea de producere a anticorpilor în agamaglobulinemia înnăscută. Anticorpii sînt numeroşi şi variaţi, corespunzînd multiplicităţii şi diversităţii antigenelor (cca un milion la om) care le provoacă formarea. Se găsesc în diferite ţesuturi, o parte dintre ei fiind imunoglobuline sau *anticorpi circulanţi* în plasmă şi în limfă iar o alta *imunoglobuline sesile*, legate de membranele celulare, îndeplinind funcţia de receptori (pe limfocitele T, B şi macrofage).

Cunoştinţele actuale asupra imunoglobulinelor sînt dobîndite prin studii făcute asupra celor ce aparţin sistemului gama plasmatic uman. Prin imunoelectroforeze se separă din aceste sisteme 5 clase diferite de imunoglobuline IgG, IgM, IgA, IgD, IgE cunoscute şi ca: gama G, gama M, gama A, gama D şi gama E globuline.

Scanned with OKEN Scanner

Funcţionînd ca anticorpi cu specificitate variată, ele posedă însă o mare heterogenitate chiar în interiorul claselor individuale care se subîmpart, la rîndul lor, în subclase, subgrupuri şi subtipuri.

6.1.1. MODEL GENERAL DE STRUCTURĂ

Numeroase cercetări bazate fie pe reducerea punţilor disulfurice fie pe proteoliza limitată, au condus la construirea unui model general de structură. În esenţă, imunoglobulinele sînt proteine policatenare alcătuite din două feluri de lanţuri peptidice, cu greutăţi moleculare şi secvenţa aminoacidică diferită (fig. XXI.6).

— *un lanţ greu „H"* de natură glicopeptidică, cu greutate moleculară de 50 000 pînă la 70 000, a cărui structură defineşte *caracterul clasei* de imunoglobuline (G, A, M, D, E). Sînt cunoscute 5 tipuri de lanţuri grele, desemnate prin litere greceşti:

γ — pentru γG (IgG);
α — pentru αA (IgA, cu notaţia veche β_2A);
μ — pentru γM (IgM, cu notaţia veche β_2M);
δ — pentru γD (IgD);
ε — pentru γE (IgE).

Diferenţa de natură între lanţurile grele este exprimată în antigenitatea proprie fiecăruia, derivată din secvenţa aminoacizilor în catena peptidică respectivă. Diferenţele de secvenţă şi dimensiuni între lanţurile H ale IgG definesc subclasele Ig: 4 pentru IgG, 2 pentru IgA, 2 pentru IgM.

— *un lanţ uşor „L"* cu greutate moleculară 20 000 comun tuturor imunoglobulinelor. Acesta există în două forme, de tipul $\varkappa$ (Kapa) şi tipul λ (lambda). Într-o moleculă de imunoglobuline lanţurile L aparţin unui singur tip $\varkappa$ sau λ. Niciodată nu se întîlnesc ambele tipuri în aceeaşi moleculă.

Ambele categorii de lanţuri H şi L au în structura lor două feluri de regiuni: unele *variabile* (V) şi altele *constante* (C), din punct de vedere al secvenţei aminoacizilor, ce intră în compoziţia lor. Simbolic ele se notează sub formele de: V_HC_H şi $V_\varkappa C_\varkappa V_\lambda C_\lambda$.

Modificări de secvenţă în regiunea constantă a lanţurilor uşoare $\varkappa$ şi λ determină *apariţia de subtipuri* ale acestora. Regiunile variabile (V) atît ale lanţurilor uşoare, cît şi ale celor grele pot să aibă deosebiri de secvenţă aminoacidică, din care rezultă subgrupe, notate prin cifre romane (ca de ex.: V_I, V_{II}, V_{III}).

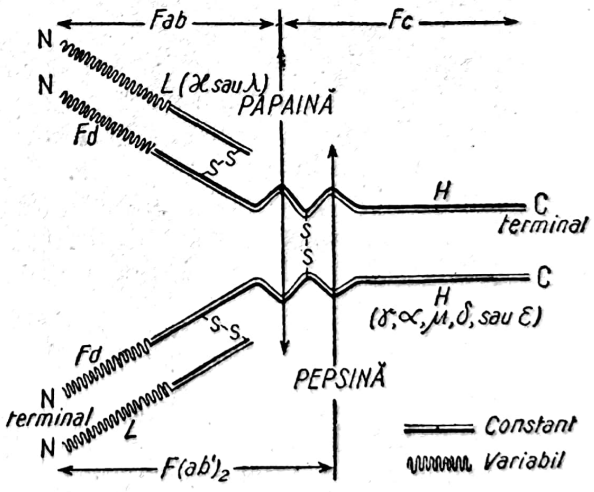


Fig. XXI.6. Model general de structură a imunoglobulinelor (anticorpilor).

Porţiunea constantă din lanţurile H conţine trei regiuni distincte: C_H1, C_H2, C_H3. Cele cinci clase de imunoglobuline sînt formate din două perechi de lanţuri H şi L, asociate în formula: L—H—H—L, prin legături disulfurice.

Scanned with OKEN Scanner

6.2. HETEROGENITATEA IMUNOGLOBULINELOR

Marea heterogenitate a imunoglobulinelor, conturată şi prin observaţiile referitoare la modelul general de structură, se explică prin trei cauze principale: (a) *specificitate izotipică*, (b) *specificitate allotipică* şi (c) *specificitate idiotipică*.

a) *Specificitatea izotipică* este legată de existenţa la toţi indivizii a claselor, subclaselor, tipurilor şi subtipurilor menţionate. Prin calcul se pot prevedea cel puţin 20 reprezentanţi diferiţi de IgG, care exprimă specificitatea izotipică a proteinei în cauză.

b) *Specificitatea allotipică* reflectă variaţii de structură moleculară determinate prin gene allele. Diferenţele de secvenţă aminoacidică se înregistrează mai ales în regiunea constantă. Pentru imunoglobulinele umane aceşti markeri allotipici sînt desemnaţi ca Inv (inhibitor Victor), pe lanţul uşor şi Gm (genetic marker) pe cel greu. Pentru sistemul Gm sînt identificate 25 variante pe lanţurile grele, localizate în majoritatea cazurilor în regiunea uşor cristalizabilă a catenei peptidice. Acestea pot fi constituite astfel:

$Gm(a^+)$ — Thr-Leu-Pro-Pro-Ser-Arg-Asp-Leu-Thr-Lys;

$Gm(a^-)$ — Thr, Leu-Pro-Pro-Ser-Arg-Met-Glu-*Glu*-Thr-L.

Grupul Gm poate fi util pentru selecţia unui donator compatibil în caz de grefă de organ. Sistemul Inv identificat pe lanţul Kapa se caracterizează printr-o substituţie unică, poziţia 19 (leucină) pentru Inv_1 şi valină pentru Inv_3. În regiunea constantă a lanţului $\varkappa$ s-au înregistrat variaţii ale aminoacizilor din poziţiile 154 şi 191.

c) *Specificitatea idiotipică* este legată de individ. Ea caracterizează produsul unei celule unice sau a unei clone celulare (ca în cazul proteinelor mielomatoase). Este proprie unui singur fel de anticorp şi unui singur individ dintr-o specie dată. Determinanţii idiotipici sînt localizaţi în situsul de combinare al anticorpilor sau într-o regiune imediat învecinată.

d) La cele trei cauze de heterogenitate prezentate se adaugă o a patra şi anume posibilitatea mutaţiilor, din care rezultă capacitatea celulelor formatoare de IgG, de a sintetiza fiecare Ig specifice, proprii. O genă stabilă codifică sinteza părţii constante a Ig la toate celulele; o genă multiplă V codifică partea variabilă a lanţului peptidic. Acesta poate suferi mutaţii, fie în timpul vieţii unui individ, prin diferenţiere somatică şi selecţie, fie în cursul evoluţiei şi selecţiei adaptative a mutanţilor. Rezultatul acestor posibilităţi este faptul că se poate ajunge la celule care sintetizează lanţuri cu V_L şi V_H diferite.

6.3. PROPRIETĂŢI FIZICO-CHIMICE ŞI BIOLOGICE

La om concentraţia imunoglobulinelor este în ansamblu de $5 \cdot 10^6$ molecule pe mm^3 de sînge. Concentraţiile relative ale imunoglobulinelor din plasma umană pot fi sugestiv reprezentate prin raport de suprafeţe (fig. XXI.7).

Principalele proprietăţi fizico-chimice ale imunoglobulinelor sînt sintetizate în tabelul XXI. 2.

Referindu-ne numai la unele caractere ale lanţurilor grele şi uşoare ce intră în alcătuirea imunoglobulinelor, redăm în tabelul XXI.3 caracteristicile lor importante.

Scanned with OKEN Scanner

Metodologia de studiu şi punere în evidenţă se bazează pe: electroforeză liberă, electroforeză de zonă, imunoelectroforeză, imunodifuzie radială, ultracentrifugare analitică, cromatografie pe coloană de schimbători de ioni (de ex. DEAE), cromatografie de afinitate.

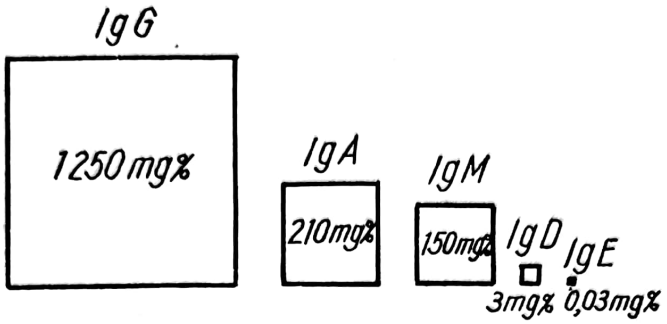


Fig. XXI.7. Concentraţia relativă a imunoglobulinelor în ser uman.

Tabelul XXI.2

Principalele proprietăţi fizico-chimice ale imunoglobulinelor umane

Proprietăţi	IgG	IgA	IgM	IgD	IgE
Constanta de sedimentare (es)	6—7	7, 10, 13, 15	19, 30—150	6—7	7,9
Greutatea moleculară în daltoni	160 000	170 000 +agregate	900 000 +agregate	184 000	190 000
Conţinut glucidic %	2,9	7,5	10,9—11,8	13	11,6
Formula moleculară	$\gamma_2\varkappa_2$ $\gamma_2\lambda_2$	$\alpha\varkappa_2$ $\alpha_2\lambda_2$ $n, n'=2, 3$	$(\mu_2\varkappa_2)_5$ $(\mu_2\lambda_2)_5$	$\delta_2\varkappa_2$ $\delta_2\lambda_2$	$\varepsilon_2\varkappa_2$ $\varepsilon_2\lambda_2$
Couceutraţla în ser (în mg %)	800—1 800	90—450	60—280	3—40	0,01—0,04
Rata sintezei în medie mg/kg/zi	33	24	6,7	0,4	0,02
T/2 în zile	23	5,8	5,1	2,8	2,4
Fixarea complementului	+	0	+	0	0
Fixare de celule	+	?	+	—	+
Trecere transplacentară	+	0	0	0	0

6.3.1. CÎTEVA ASPECTE DE COMPOZIŢIE CHIMICĂ ŞI STRUCTURĂ

Sînt în prezent cunoscute date comparative referitoare la compoziţia în aminoacizi a principalelor imunoglobuline serice umane (γG, γA, γM) din serul uman normal şi patologic (gama — macroglobuline reacţionale şi macroglobuline Waldenstrőm). S-au menţionat diferenţe semnificative între diferitele tipuri. Se insistă asupra faptului că toate categoriile subliniate sînt foarte bogate în anumiţi aminoacizi: acid glutamic, prolină, leucină şi mai ales serină treonină.

a) *Componenta glucidică* este variabilă cantitativ cu clasa imunoglobulinelor, atingînd valoarea cea mai ridicată în IgM şi cea mai scăzută IgG.

Tabelul XXI.3

Caracteristici importante ale lanţurilor grele (H) şi ale celor uşoare (L)

Lanţuri şi caracteristici	IgG	IgA	IgM	IgD	IgE
Lanţuri grele (H)					
Greutate moleculară	50 000—53 000	56 000—64 000	65 000—70 000	69 000	72 500
Clase					
Allotipuri	Gm	—	—	—	—
Lanţuri uşoare (L)					
Greutate moleculară	22 000—23 000	22 000—23 000	22 000—23 000	22 000—23 000	22 000—23 000
Tipuri	κ, λ	κ, λ	κ, λ	κ, λ	κ, λ
Allotipuri	Inv	Inv	Inv	—	—

Ea conţine: hexoze (manoză, galactoză), N-acetil-glucozamină, acid sialic şi fucoză. S-a studiat mult legătura dintre componenta glucidică şi lanţul peptidic H (în care este foarte concentrată). Legătura este de tip *iminoeter*, care reuneşte funcţia amidă a unui rest de asparagină cu funcţia reducătoare a N-acetilglucozaminei. Este deci o legătură glicozil-aminil caracteristică unui număr mare de glicoproteine. Structura lanţului peptidic, vecin punctului de legătură în γG este:

Glu-Glu-Tir-Glu-Asp-Ser-Thr
|
Glican

În γM componenta glucidică este foarte importantă, raportul de greutăţi moleculare fiind de 9 000 daltoni componenta glucidică din cei 70 000 daltoni, greutatea moleculară a lanţului peptidic respectiv. Legătura se face tot prin intermediul unui rest de acid aspartic (ca mai sus).

b) *Componenta peptidică.* Secvenţa aminoacidică în lanţurile uşoare sau grele din Ig normale nu a putut fi studiată datorită marii variabilităţi a componentelor. Proteinele Bence-Jones, izolate în stare de puritate (din urina unor bolnavi cu mielom) asimilate cu lanţuri uşoare de tip Kapa sau Lambda au dat posibilitatea cunoaşterii structurii primare a acestor lanţuri peptidice patologice. Lanţul Kapa conţine 214 aminoacizi, grupaţi în regiuni cu compoziţie constantă şi variabilă. Extremitatea C terminală a lanţului (aminoacidul 214) este cisteina care se leagă prin punte disulfurică, cu restul cisteină din lanţul greu (IgG_1). În regiunea variabilă a lanţului, 73 de poziţii prezintă diferenţe de la pacient la pacient. În regiunea constantă sînt observate numai variaţiile din poziţia 191 legate de allotipul Inv (leucina în Inv a^+, valina în Inv b^-).

În lanţul λ numărul de aminoacizi este cuprins între 213—216. Cisteina care face legătura cu lanţul H nu este în poziţie C terminală ci în cea imediată, precedentă. Unele lanţuri λ au capătul N terminal blocat, sub formă de acid pirolidon-carboxilic (PCA). În regiunea variabilă s-au găsit un număr de numai 50 de poziţii cu aminoacizi variabili cu individul. În regiunea constantă se cunosc două variaţii importante: poziţia 154 (Kern) şi 191 (Oz) (fig. XXI.8).

Scanned with OKEN Scanner

c) *Secvența peptidică a lanțurilor grele.* Din ansamblul datelor obținute, rezultă că lanțul greu conține resturi de 450 aminoacizi, într-o secvență unipeptidică, repartizați în două regiuni cu compoziție constantă și variabilă. Aceasta se leagă de componenta glucidică prin intermediul unui rest de acid aspartic. Au fost elucidate cîteva aspecte de structură. Astfel, în lanțul gama (din γG) extremitatea N terminală nu are grupare NH_2 liberă ci este de tipul acidului piroglutamic (Piro-Glu-Val-Thr). Extremitatea C terminală este de tipul: -Ser-Pro-Gli (COOH).

Steiner și Porter au determinat structura primară a fragmentelor peptidice ce iau parte la legătură dintre lanțurile ușoare și cele grele, pentru o imunoglobulină patologică de tip IgG. În această situație s-a subliniat prezența a patru resturi de prolină, prezente în zona de legare a celor două lanțuri grele.

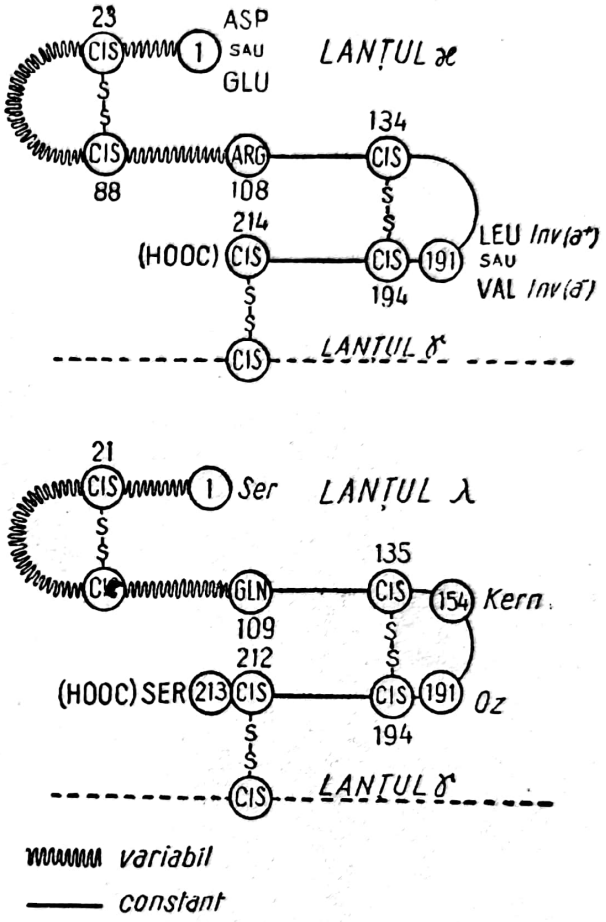


Fig. XXI.8. Structura schematică a lanțurilor ușoare (κ, γ), din imunoglobuline (după Polonowski, adaptat).

6.3.2. CLASE ȘI STRUCTURI PARTICULARE ALE IMUNOGLOBULINELOR

IgG reprezintă 70—80% din sistemul gamaglobulinic plasmatic, concentrația sa medie fiind de 12 g/l. Este sintetizată în măduvă osoasă, splină, ficat, ganglioni limfatici și este globulina care asigură *răspunsul imun secundar*. Ea poate fi socotită prototip de anticorpi. Aparține unui tip de proteină tetramerică, simetric construită, ale cărei subunități sînt asamblate prin legături necovalente și punți disulfurice. După scindarea reductivă a acestor legături prin acțiunea mercaptoetanolului și a ureii sau a ditiotreitolului, se liberează două perechi de catene polipeptidice și anume: două lanțuri grele „H" (50 000 daltoni) și două lanțuri ușoare (28 000 daltoni). Mercaptoetanolul și ureea rup și punțile disulfurice intercatenare. Fiecare lanț ușor este unit cu un lanț greu printr-o punte disulfurică. Numărul legăturilor disulfurice, dintre cele două lanțuri grele (H) este diferit la om în funcție de subclasa în care se situează (fig. XXI.9), (Steward — 1974). Ansamblul structural a fost schematizat de Porter. După reducerea punților disulfurice, lanțurile peptidice obținute pot fi separate, fie prin cromatografie de filtrare în gel, fie prin

Scanned with OKEN Scanner

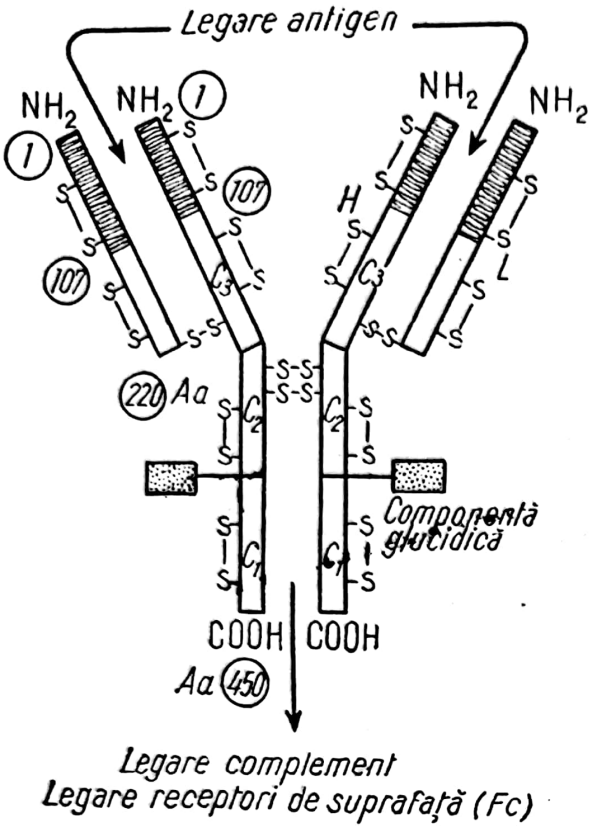
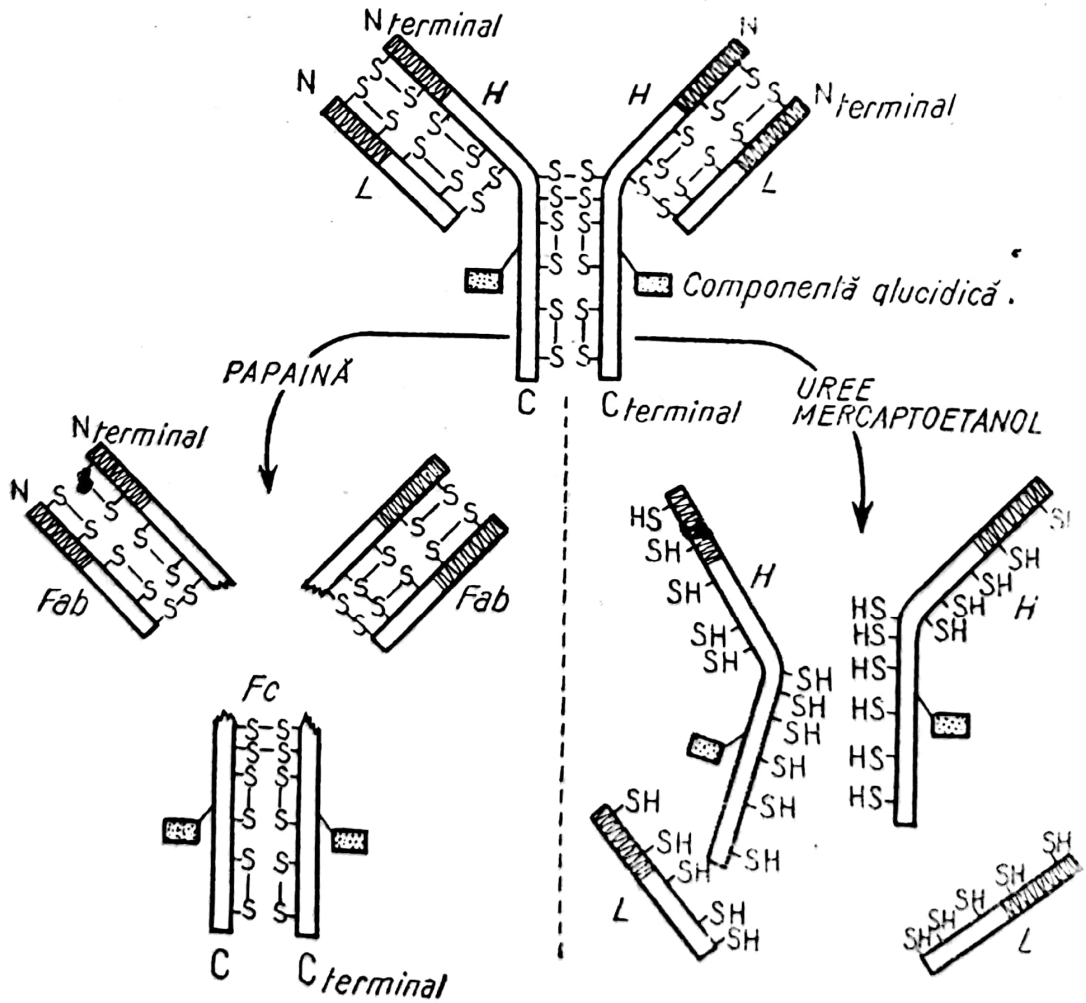


Fig. XXI.9. **Structura schematică a unei γ-globuline (adaptare după Porter).**

Fig. XXI.10. **Cele trei fragmente (2 Fab şi 1 Fc) libertate de IgG prin hidroliză proteolitică. Ruperea punţilor disulfurice prin tratare cu mercaptoetanol şi uree.**



Scanned with OKEN Scanner

electroforeză de zonă (Porter, Cohen, Edelman, Poulik). Scindarea prin hidroliză proteolitică la nivelul așa-numitei regiuni „balama", flexibilă și ușor accesibilă acțiunii proteolitice, liberează trei fragmente (fig. XXI.10). Dintre acestea, două constau în lanțurile ușoare „L" și capătul N-terminal al lanțului greu „H" (F.d) împreună denumite F (ab)=antigen binding. Fiecare fragment F (ab) conține un singur situs de combinație cu antigenul. Cel de al treilea fragment, denumit Fc (ușor cristalizabil), cu greutate moleculară 50 000 daltoni, conține cele două capete C terminale ale lanțului „H", unite printr-o legătură disulfurică și legături necovalente. Fragmentul Fc hotărăște clasa, $\frac{T}{2}$ (timpul de înjumătățire), fixarea complementului și trecerea transplacentară a anticorpului. Scindarea proteolitică prin *pepsină* degradează fragmentul Fc la o fracțiune mai mică, pFc cu greutate moleculară 25 000 și liberează două fragmente F(ab) legate împreună printr-o punte disulfurică între lanțurile „H". Ele alcătuiesc fragmentul denumit $F(ab')_2$ care posedă cele două situsuri de combinare ale anticorpului, situate în zonele variabile. În ansamblul IgG subclasa majoritară este IgG_1 (70%), după care urmează IgG_2 (16%), IgG_3 (10%), IgG_4 (4%).

6.3.2.1. *Domeniile imunglobulinelor.* Cercetările lui Edelman asupra unei IgG mielomatoase (IgG_1 Eu) au arătat că în porțiunea constantă a lanțului greu (C_H) există trei regiuni de omologie: C_H1, C_H2, C_H3, omoloage atît între ele cît și cu regiunea constantă (C_1) din lanțul ușor. Atît regiunile C_H1, C_H2, C_H3, cît și regiunile C_L, V_L, V_H sînt grupate în domenii compacte. Ele au greutate moleculară 12 000 daltoni, conținînd fiecare cca 100 aminoacizi, fiind unite între ele prin legături peptidice scurte.

Fiecare domeniu îndeplinește o funcție specifică:

— V_L și V_H alcătuiesc *situsul de combinare al anticorpului*, cu antigenul, pe principiul complementarității;

— C_H2, C_H3 din Fc mediază celelalte funcții biologice ale anticorpului. C_H2 posedă situsul de fixare al complementului și foarte probabil și pe acela care controlează catabolizarea Ig.

În soluție, IgG are forma moleculară T, în absența antigenului și forma în Y, în prezența acestuia. Legătura antigen-anticorp „demască" situsul de fixare al complementului (Steward 1974 — Edelman 1970), (fig. XXI.11).

— C_H3 ar conține (Dorrington și Painter, 1974) situsul de combinare al anticorpilor cu receptorii Fc celulari. Autori din 1976 sugerează că în această legătură ar interveni ambele domenii C_H2 și C_H3.

IgA se găsește în ser și secrețiile umane. În ser există sub două forme: cea monomerică IgA_1, majoritară (93%) și cea dimerică IgA_2, în care lanțurile ușoare sînt dimerizate prin legături disulfurice și unite cu lanțurile grele de hidrogen (fig. XXI.12).

Dimerizarea se realizează prin intermediul unui polipeptid bogat în cisteină — „Joining-Protein" — (J).

IgA_s secretoare (greutate moleculară 380 000—400 000 daltoni) a fost identificată în secrețiile sero-mucoase — salivă, lacrimi, secreții nazale, gastro-intestinale, pulmonare, sudoare, colostru. Are forma dimerică (80—90%) și este combinată cu o glicoproteină „G.S", componenta secretorie, care ar facilita transportul imun al globulinei A prin membrane în secreții. Este sintetizată de plasmocitele ce se găsesc în epiteliile mucoase. Prin asociere cu „G.S." — rezistentă la proteoliză — IgA_s poate exercita funcția de apărare

Scanned with OKEN Scanner

locală a mucoaselor. Aceste proprietăţi ale IgA au permis conturarea noţiunii de sistem imunologic secretor care exercită imunitatea locală, în timp ce sistemul imunologic umoral asigură imunitatea sistemică.

IgM are structură circulară, pentamerică. Este imunoglobina răspunsului imun primar. Fiecare monomer este structurat în mod asemănător cu IgG, cu deosebire că între lanţurile grele μ, nu există decît două legături disulfurice, dintre care una este aşezată la capătul C terminal al lanţului (fig. XXI.13).

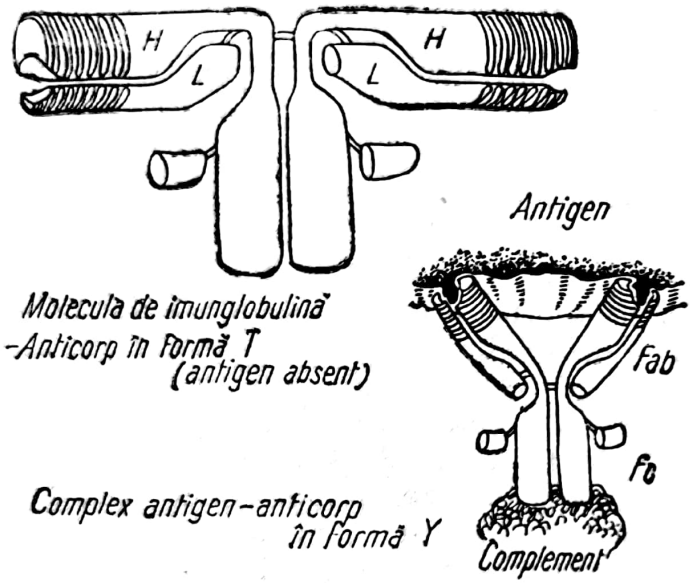


Fig. XXI.11. Model schematic al legăturii antigen-anticorpi.

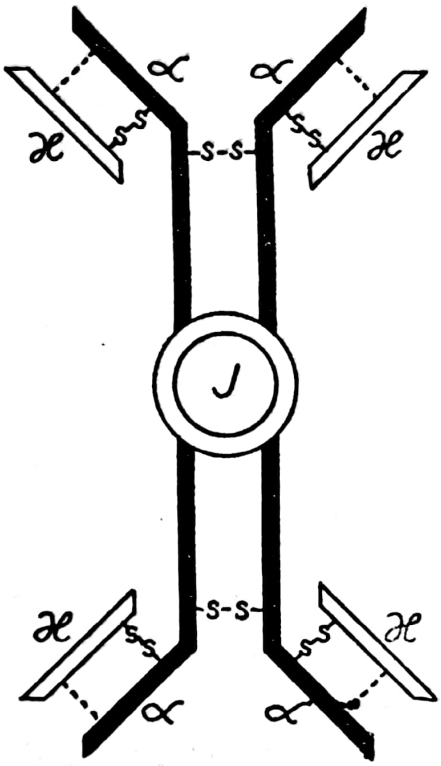


Fig. XXI.12. Structura IgA dimerică.

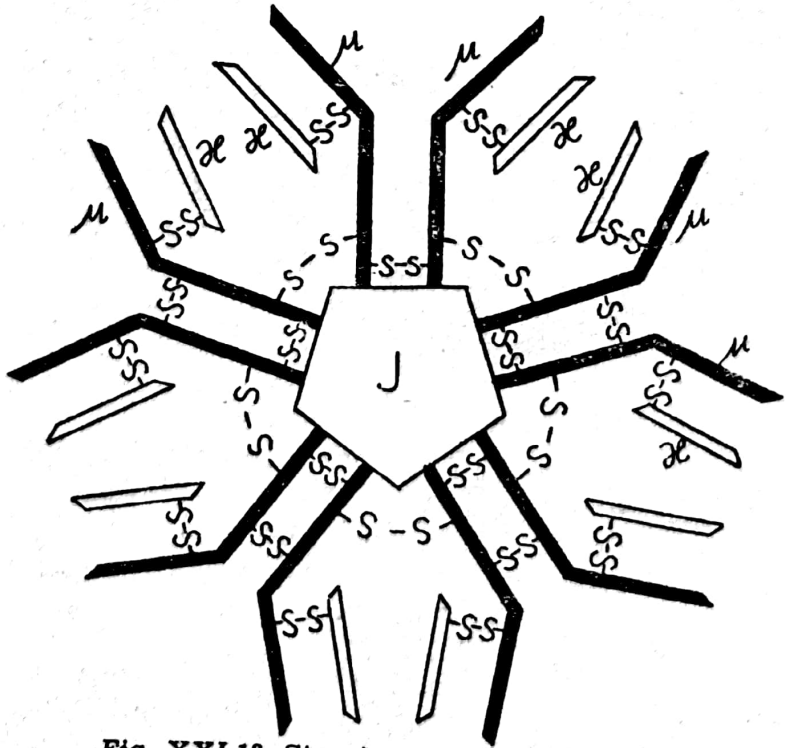


Fig. XXI.13. Structura pentamerică a IgM.

Valența anticorpilor din clasa IgM este influențată de dimensiunea antigenului. Pentru dextran de diferite greutăți moleculare, valența anticorpului variază între 2—10.

IgD se găsește în plasmă în concentrație mică, crescută semnificativ la gravide, în timpul travaliului. Rolul specific ca anticorp al acestei imunoglobine nu este elucidat. Se conturează (1973—1975) implicațiile sale în alcătuirea receptorilor pentru antigen, în special pe limfocitele B. Se pare că receptorii IgD de pe limfocite ar fi stimulatorii pentru diviziunea și diferențierea acestor celule.

IgE conține anticorpii reaginici (Ishizaka și colab., 1967), răspunzînd de reacțiile de hipersensibilitate imediată de tip anafilactic.

7. SITUSUL DE COMBINARE A ANTICORPILOR. REACȚIA ANTIGEN-ANTICORP

Se știe în prezent că atît segmentele V_H cît și V_L alcătuiesc *situsul de combinare* fără a se cunoaște exact măsura precisă a contribuțiilor relative. Sînt făcute studii interesante pe baza metodei de marcare prin afinitate care vin în sprijinul aserțiunii de mai sus. Situsul este așezat în fragmentele F(ab), alcătuit din lanțul L și fragmentul Fc din lanțul H.

Se pare că partea V_H este preponderent implicată în legarea antigenului. Se presupune că situsul de legare al moleculei de anticorpi este ca o despicătură cu structură complementară antigenului și de mărime corespunzătoare acestuia. Se acceptă că situsul cuprinde 10—15 resturi de aminoacizi din lanțul peptidic. Mărimea determinantului antigenic al unui oligopeptid sau oligozaharid, corespunde la 10—15 resturi aminoacide, care determină specificitatea legăturii. Deoarece molecula de anticorp (IgG — de exemplu), are o structură flexibilă, cele două ramuri în formă de „Y" se pot acomoda la poziția determinantului antigenic. Punctul în jurul căruia se face rotirea este situat într-o regiune a lanțului, care posedă un șir de resturi prolină. Acestea măresc capacitatea de rotire liberă a lanțului polipeptidic. Deoarece procesul se petrece repede, energia de legătură nu trebuie să fie prea ridicată. Intervin interacții hidrofobe, se stabilesc punți de hidrogen. Pot fi implicate încărcături electrice diferite (sarcini ale grupelor $-NH_3^+$ și $-COO^-$) întocmai ca în interacțiile enzimă-substrat, receptor hormon. Anticorpul ce posedă pe suprafața lui mai multe locuri de legătură, poate intra în interacție cu două molecule de antigen. În prezența anticorpilor specifici se produc agregate mari, care sînt legate prin punți de anticorpi și sînt mai bine fagocitate de leucocite.

8. IMUNOGLOBULINE LEGATE (SESILE) DE MEMBRANELE CELULARE

8.1. RECEPTORII DE SUPRAFAȚĂ AI CELULELOR IMUNOCOMPETENTE

Procesul de recunoaștere imunologică este un fenomen ce se realizează la suprafața celulelor antigen-reactive, prin intermediul receptorilor imunoglobulinici, specifici pentru antigen. Este unanim acceptat că limfocitele B

Scanned with OKEN Scanner

posedă receptori imunoglobulinici, detectabili prin imunofluorescenţă. Prezenţa acestor receptori imunoglobulinici pe limfocitele T este controversată. Totuşi, chiar dacă există, ei nu sînt accesibili anticorpilor fluorescenţi specifici,

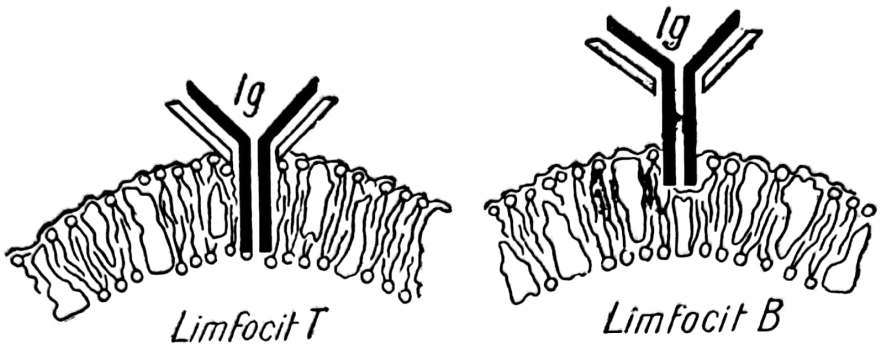


Fig.XXI.14. Model ipotetic pentru situarea receptorilor imunoglobulinici în membrana limfocitelor T (adaptat după I. Marschalonis şi R. Cone).

fapt care pare să ţină de aşezarea lor în membrana celulară. Un model ipotetic datorat lui Marchalonis J. şi R. Cone, pentru situarea receptorilor imunoglobulinici în membrană, explică diferenţa dintre leucocitele B şi T.

Pentru limfocitele B este admis că regiunea F(ab) şi cea mai mare parte a regiunii Fc sînt libere la suprafaţa celulei.

Pentru limfocitele T regiunea Fc este aproape în întregime ascunsă între diferitele componente de suprafaţă din membrană. Totuşi ambele tipuri de celulă ar putea fixa antigenul, deoarece domeniile variabile ale lanţurilor L şi H, în care este situat situsul de combinare, este liber (fig. XXI.14).

8.2. BETA$_2$-MICROGLOBULINE ŞI ANTIGENELE HL-A

În cercetări recente se ia în consideraţie posibilitatea ca receptorii de' pe suprafaţa limfocitelor T, să fie asociaţi cu β-2-microglobulinele. Acestea există pe suprafaţa limfocitelor în două forme moleculare: (1) ca parte integrantă a complexului de histocompatibilitate HL-A şi (2) ca moleculă liberă nelegată cu alte macromolecule din membrană. Studiile lui Strömінger şi colab. (1976) sugerează identitatea lanţului uşor al antigenelor HL-A (de histocompatibilitatea majoră) cu β-2-microglobulinele. Acestea au trăsături structurale comune cu regiunile de omologie constantă ale lanţurilor Ig uşoare, cît şi ale celor grele (C_L, C_H1, C_H2, C_H3). În mod special este subliniată asemănarea cu regiunile carboxiterminale C_H3, C_H4. Proprietăţile β_2-microglobulinelor sugerează că gena codificatoare s-a născut dintr-o genă precursoare, care prin duplicare condiţionează lanţurile imunoglobulinice şi grele.

Receptorii pentru antigen aparţin mai ales clasei IgM şi IgD; un număr mic de limfocite (sub 1%) posedă receptorii IgG sau IgA. Pe lîngă receptorii imunglobulinici, limfocitele şi macrofagele posedă şi receptori pentru imunoglobuline, implicaţi în fenomenele de interrelaţie celulară, ce conduc la realizarea răspunsului imun. Pe suprafaţa limfocitelor B se găsesc receptorii Fc — de natură proteică sau glicoproteică — pentru porţiunea C terminală a moleculelor de imunoglobuline. Pot fi identificaţi prin celule „indicatoare", sensibilizate (eritrocite de oaie), ce aderă la limfocite realizînd forme desemnate ca „rozeta EA". Se mai găsesc pe aceeaşi suprafaţă receptori C' pentru comple-

Scanned with OKEN Scanner

ment identificaţi cu eritrocite de oaie sensibilizate cu anticorpi şi incubate cu complement. Se produc aşa-numitele „rozete EAC" (fig. XXI.15).

Macrofagele posedă şi ele receptori Fc şi C' (fig. XXI.16).

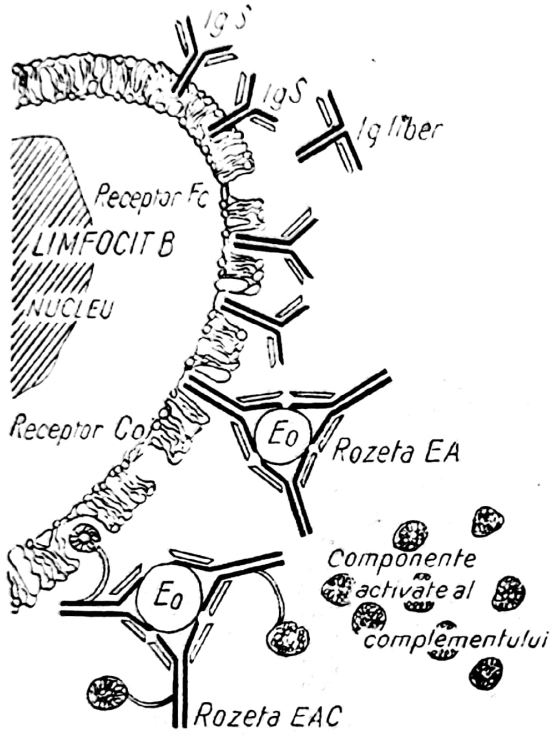


Fig. XXI.15. Receptorii de suprafaţă pe limfocitele B: rozetă EA, rozetă EAC.

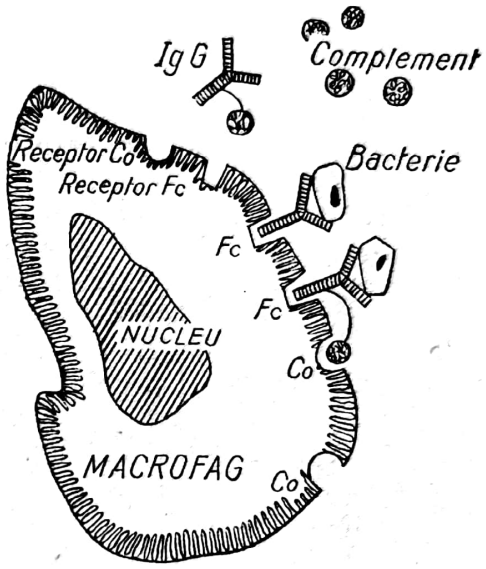


Fig. XXI.16. Receptorii de suprafaţă ai macrofagului.

Pe baza existenţei acestor receptori, atît a celor imunoglobulinici pentru antigene specifice, cît şi a receptorilor pentru imunoglobuline (Fc) s-au elaborat modele pentru interacţiile celulare atît în imunitatea umorală, cît şi în cea celulară.

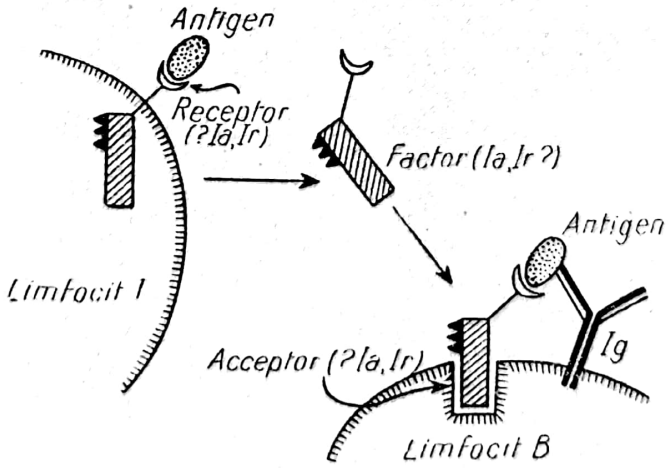


Fig. XXI.17. Model Taussig-Munro pentru interacţiile celulare imunitare.

Scanned with OKEN Scanner

Taussig şi Munro plecînd de la ipoteza existenţei unor receptori de suprafaţă, neimunoglobulinici, produşi ai genelor de răspuns imun (Ir) au elaborat un nou model de interacţie celulară în răspunsul imun. Un receptor, denumit „factor" ar fi implicat în recunoaşterea antigenului de către celulele T. Aceşti receptori s-ar desprinde împreună cu antigenul de pe suprafaţa celulelor T şi ar reacţiona specific cu celulele B, inducînd în descendenţa acestora sinteza de anticorpi specifici (fig. XXI.17).

9. BIOSINTEZA ANTICORPILOR

Proteinele anticorp sînt sintetizate de plasmocite. Mecanismul care stă la baza acestei sinteze este incomplet cunoscut. Se admite că el este declanşat de complexul ARN-macrofagic-antigen care iniţiază interacţiunea celulelor ce conduc la producerea şi liberarea imunoglobulinelor în circulaţie. Transcripţia informaţiei genetice în moleculele de ARN mesager individuale, este urmată de translaţia de poliribozom, de dimensiuni adecvate celor două tipuri de lanţuri: 4—5 ribozomi pentru tipul L şi 11—18 pentru tipul H. Sinteza porneşte de la capătul N terminal către C terminal, ca pentru orice proteină. În timpul sintezei lanţurilor grele H aminozaharurile se leagă glicozidic de anumiţi aminoacizi din lanţul peptidic (de ex. galactozamino-treonină, glucozamină-aspartat). Lanţurile grele rămîn ataşate de poliribozomii formatori, pînă ce se combină cu lanţurile uşoare, ce se liberează rapid de pe poliribozomii respectivi, intrînd în fondul celular. În mod normal lanţurile H nu există libere în celulă. Ca ritm de producere se admite că se formează pe minut două lanţuri L şi un lanţ H ce se leagă în formula H—H şi H—L. Ordinea în care se stabilesc legăturile disulfurice este în funcţie de specie. La om stabilirea legăturilor H—H precede pe cea a legăturilor H—L. Imunoglobulinele produse se transportă prin cisternele reticulului endoplasmatic, unde în acelaşi timp se completează lanţul polizaharidic, prin acţiunea monozaharid-transferazelor. Structura tetracatenară se perfectează în spaţiul cisternal. Mai departe moleculele trec în aparatul Golgi, unde se fixează ultimele glucide şi apoi în veziculele secretoare, care conlucrează cu membrana plasmocitului, de unde sînt liberate în circulaţie. Polizomii IgM nu au putut fi identificaţi în celule deoarece polimerizarea se petrece cu puţin timp înaintea secretării. Transportul în celulă durează 8—20 minute.

9.1. CONTROLUL GENETIC AL SINTEZEI Ig

Biosinteza celor două tipuri de lanţuri L şi H este controlată de două gene allele, dintre care numai una este activă în momentul sintezei, producîndu-se fenomenul de „excluzie" allelică autosomală, cunoscută numai în biologia moleculară a imunoglobulinelor. Date relativ recente (1965) pornind de la existenţa regiunilor variabile şi constante în lanţurile H şi L, sugerează ideea că fiecare dintre acestea este codificat de două gene (V şi C) care se combină pentru a forma gena structurală VC, din celulele imunocompetente. Se discută un mecanism electiv de integrare în genom, în care genele V_H selecţionate sînt incluse adjuvant genelor C_H (C_γ, C_μ, C_α, C_δ) în acelaşi cromozom. În general, există un număr foarte mare de gene V diverse, ce se transmit pe cale germinativă sau se produc prin mutaţii somatice întîmplătoare.

Scanned with OKEN Scanner

9.2. TEORIILE FORMĂRII ANTICORPILOR

Pentru a explica formarea anticorpilor există azi două puncte de vedere exprimate principal în două teorii:

a) *teoria informațională* sau instructivă directă, sau indirectă și

b) *teoria selectivă* în special în forma teoriei selecției *clonale*, emisă de Burnet.

În teoria instructivă directă sau a „tiparului" direct, determinantul antigenic pătruns în celulă servește drept matriță pentru configurarea anticorpului, complementar stereochimic antigenului. În teoria instructivă indirectă se admite posibilitatea unei modificări, pe care antigenul o induce în gena care codifică sinteza imunoglobulinelor. În ambele situații este vorba deci de o „instructare directă sau indirectă" a celulelor producătoare de anticorpi.

În teoriile selective se presupune că informația de structură pentru orice fel de anticorpi preexistă în genomul celulelor formatoare sau numai al unora dintre acestea (clone). Antigenul acționează ca de represor al informației genetice preexistente.

10. FACTORI ȘI MECANISME DE REZISTENȚĂ NESPECIFICĂ

10.1. SISTEMUL COMPLEMENT

Este un ansamblu de proenzime din ser și din alte umori ale organismului, care împreună cu anticorpii și alți factori joacă rol de mediatori, în reacțiile imune și alergice. Este principalul sistem efector al activității anticorpilor. Denumirea i-a fost dată de Bordet cu semnificația că acest factor completează acțiunea anticorpilor specifici asupra antigenului. Sistemul activat pune în mișcare o serie de procese care conduc la distrugerea microorganismelor. El poate deveni însă agresiv și față de structurile proprii ale organismului respectiv. Corespunzător faptului consemnat de Büchner — alexina (sau complementul) prezentă în serul proaspăt și necesară distrugerii bacteriilor, apare filogenetic la poikiloterme (amfibii, pești) dar este bine dezvoltată numai la verterbratele homeoterme.

10.1.1. NOMENCLATURA ȘI BIOCHIMIA COMPLEMENTULUI

Sistemul este constituit din nouă componente, α, β, și gama globuline, incluzînd în plus ioni de Ca^{++} și Mg^{++} și cel puțin 5 inhibitori (inactivatori). Nomenclatura modernă indică 9 componente, de la C'1—C'9, care sub forma activată au ca simbol C'1a—C'9a. Se poate vorbi de 11 componente dacă se ține seama de faptul că primul component al complementului C'1 este format din trei proteine: C'1q, C'1r, C'1s. În ser se găsesc inactivatori naturali, în special pentru C'1, C'3, C'6. Cifrele ce servesc la desemnarea proteinelor complementului corespund ordinei în care ele intră în reacție, în hemoliza

Scanned with OKEN Scanner

Tabelul XXI.4

Componentele sistemului complement din serul uman

Proprietăți	C'1q	C'1r	C'1s	C'2	C'3	C'4	C'5	C'6	C'7	C'8	C'9
Concentrația serică în μ/gml	100—200	—	22	10	1 200	430	75	—	—	—	1—2
Coeficient de sedimentare	11,1S	7S	4S	5,5S	9,5S	10S	8, 7S	5—6S	5—6S	8S	4,5S
Greutate moleculară	400 000	—	—	115 000	24 000	230 000	—	—	—	—	79 000
Hidrați de carbon %	17	—	—	—	2,7	14	19	—	—	—	—
Grupări SH reactive	—	—	—	1 sau mai multe	2	—	—	—	—	—	—

Scanned with OKEN Scanner

umană cu excepţia componentei C'4, care reacţionează după C'1 şi înainte de C'2*.

Principalele date biochimice privitoare la componentele complementului sînt cuprinse în tabelul XXI.4. Sînt de subliniat, în mod special, cîteva aspecte biochimice particulare. Cele trei proteine ce alcătuiesc componenta C'1 sînt asamblate într-un complex macromolecular, stabilizat prin ionii de Ca^{++}. Complexul poate fi disociat prin chelatarea Ca^{++} iar subunităţile componente pot fi separate în continuare prin ultracentrifugare şi cromatografie pe DEAE celuloză.

C'1q poartă situsul de combinare al lui C'1 cu complexul antigen-anticorp, identificat cu componentul 11,1S. Prin afinitatea sa pentru anticorpi el face legătura funcţională între anticorpi şi sistemul complement. C'1q conţine o mare cantitate de glicină, hidroxiprolină şi lizină, care denotă o analogie cu colagenul. C'1s este denumită şi C'1-esteraza şi există sub forma de proenzimă sau proesterază. După activare poate hidroliza „in vitro" substraturi cu caracter de esteri, iar „in vivo" se comportă ca polipeptidază, acţionînd asupra componentelor C'4 şi C'2 substraturile sale naturale. Dintre cei cinci inactivatori naturali ai sistemului complement, menţionăm prezenţa în serul uman a α_2-globulinei cu acţiune frenatoare asupra C'1 esterazei (forma activă a lui C1s) desemnat ca EI (inhibitor al esterazei). Prin scindare proteolitică a componentelor sistemului complement se produc fragmente de mărime diferite notate a, b.

10.1.2. UNITĂŢI FUNCŢIONALE ALE COMPLEMENTULUI

Componentele sistemului complement lucrează printr-un lanţ de reacţii de activare în *„cascadă"* analog celor ce se petrec în fenomenele de coagulare şi fibrinoliză. Activarea complementului este precedată obligatoriu de o fază specifică de formare a complexului antigen-anticorp, pe care se fixează nespecific C'1, declanşînd activarea secvenţială a celorlalte componente. Cele 11 componente proteice ale sistemului complement pot fi considerate în esenţă ca subunităţi a 3 unităţi funcţionale macromoleculare, după cum urmează:

a) *unitatea de identificare şi alarmă*, macromolecula C'1q, rs care „recunoaşte" non-selful. C'1q este elementul de identificare, avînd capacitatea de a se combina cu complexele antigen-anticorp, datorită receptorilor situaţi pe segementul Fc al anticorpului. C'1q este activat de triptofanul conţinut în lanţul peptidic al anticorpului. Numai imunoglobulina M şi anumite subclase ale imunoglobulinei G (IgG) au capacitatea de a fixa şi activa gruparea C'1q, rs.

b) *Unitatea de activare a elementelor* răspunzătoare de citoliză cuprinde componentele C'4, C'2, C'3, derivatele lor şi ionii de Mg^{++}. Procesul este declanşat prin C'1s care scindează componenta C'4 cu producerea enzimei C'4b, 2a, 3b, cu rol capital în activare, avînd ca substrat proteina C'5. Concomitent sînt mediate reacţii inflamatorii cu liberare de histamină din mastocite, anafilatoxine din leucocite şi trombocite, fenomene de imunoaderenţă**, de imunoaglutinare***, facilitarea fagocitozei. Intervenţia complemen-

---

* Această anomalie derivă din faptul că numerotarea a fost stabilită înainte de a se fi determinat complet cronologia reacţiilor.

** Imunoaderenţă = aderenţa celulelor între ele sau la leucocite. Facilitează fagocitoza.

*** Imunoaglutinare = fragmentul C'3b şi în mai mică măsură C'4, fixate pe un complex antigen-anticorp induc formarea de anticorpi C'3b şi C'4 numiţi conglutinine.

Scanned with OKEN Scanner

tului în fagocitoză reprezintă cel mai important rol biologic al acestui sistem. Factorii rezultaţi din activarea complementului sau unii anticorpi care favorizează fagocitoza sînt denumiţi opsonine.

c) *unitatea de citoliză propriu-zisă* cuprinde proteinele C'5b, C'6b, C'7b, C'8b, C'9b. Complexul trimolecular C'5b, 6, 7 reprezintă primul stadiu al unităţii de citoliză C5b—9, care lizează membranele celulare. Combinaţia

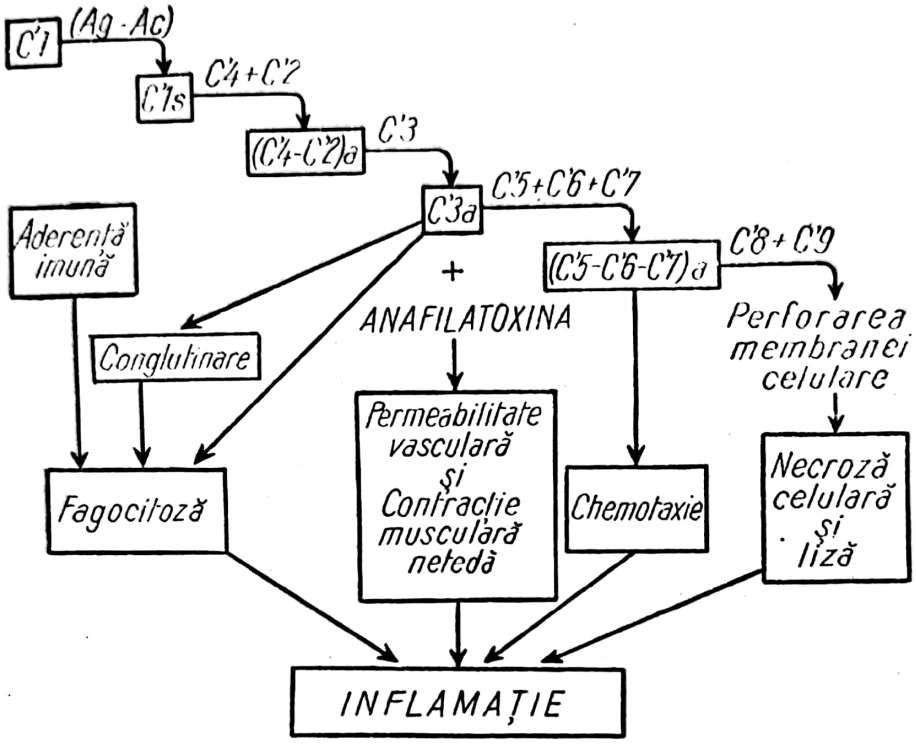


Fig. XXI.18. — Mecanismul de acţiune ale celor 3 unităţi funcţionale ale sistemului complement (litera a indică starea activată).

complexului C'5b, 6, 7, cu hematiile poate conduce la pătrunderea sa în dublul strat fosfolipidic, al membranei eritrocitare. Leziunile membranei, perforarea acesteia apar după intervenţia componentelor C8, C9. În primul stadiu, concomitent cu şi prin scindarea proteinei C5 se produce factorul chimiotactic* C5a, care are şi capacitatea de a media liberarea de histamină din celulele în care este depozitată (mastocite). Mecanismul de acţiune al celor trei unităţi funcţionale macromoleculare ale componentului este redat în fig. XXI.18.

10.1.3. MECANISMUL DE ACTIVARE A COMPLEMENTULUI

În esenţă şi pînă în prezent, sînt acceptate două căi de activare:

— *activare completă sau hemoliza imună* care se realizează printr-o activare secvenţială a tuturor componentelor, deci completă;

— *o cale şuntată* (alternă sau properdinică) care implică numai activarea componentelor terminale (de la C3—C9).

Ambele căi coexistă în organism şi se pot suplini în situaţii de necesitate, create prin deficienţe calitative sau cantitative ale unora.

---

* Factor chimiotactic = factor ce favorizează migrarea leucocitelor spre zona de activare a complementului.

Scanned with OKEN Scanner

Fenomenele biologice în care intervine sistemul complement sînt fenomene de citotoxicitate cu citoliza sub cele două forme mai importante: hemoliza autoimună şi bacterioliza, fenomene inflamatorii (chemotaxia, fagocitoza, imunoaglutinarea etc.), fenomenele de coagulare, prin activarea factorului Hageman, activarea coagulării intravasculare, a plasminogenului, a fibrinolizei, a calicreinei cu apariţie de substanţe vazoactive (bradichinină) cu vazodilataţie şi creşterea permeabilităţii vasculare.

10.1.4. PATOLOGIA COMPLEMENTULUI

În patologia înnăscută a complementului se cunosc la om deficienţe şi anomalii: deficienţa de C'1 — edem angioneurotic ereditar —, precum şi deficienţe privind componentele C'1q, r, s, şi C'2, C'4, C'3, C'5. Se cunosc şi anomalii ale componentelor terminale ale sistemului. În patologia dobîndită, sînt investigate variaţiile complementului în stări infecţioase, în lupusul eritematos difuz. În cazul rejecţiei de grefă complementul intervine indirect prin activarea C'4 şi C'3 conglutininelor şi creşterea catabolismului componentelor.

10.2. PROPERDINA

*Properdina** este o euglobulină a cărei acţiune face ca zimozanul, un polizaharid din drojdie să anihileze complementul prin absorbţia C'3. Consecinţa absorbţiei serului cu poliozidul respectiv este pierderea capacităţii bactericide în special faţă de germenii Gram⁻ şi a celei virulicide şi hemolitice. Acţiunea properdinei este corelată cu a sistemului complement. Ocolind primii factori ai complementului ea determină o activare a C3 şi a secvenţei următoare a componentelor. Se pare că la om şi animale există o relaţie între nivelul properdinei şi imunitatea naturală. Nivelul seric scade la canceroşi şi ca efect nociv al radiaţiilor ionizante.

10.3. INTERFERONUL

Celulele infectate cu un virus produc o proteină specifică, interferonul, substanţă care interferă cu înmulţirea virusurilor. Este probabil ca ARN dublucatenar al virusurilor să fie inductorul formării interferonului. Elaborarea interferonului poate fi stimulată prin polinucleotide sintetice cu greutate moleculară ridicată (100 000) sau prin polianioni. Interferonul uman este *heterogen*. El posedă o unitate de bază cu o greutate moleculară de 12 000. Heterogenitatea interferonului rezultă atît din numărul variabil de oligomeri, cît şi din diferenţele de încărcătură electrică, în funcţie de conţinutul în acid sialic al unităţii respective.

Mecanismul său de acţiune nu este elucidat. Sînt două ipoteze explicative, mai importante:

— nivelul de intervenţie al interferonului ar fi acţiunea sa asupra ARN polimerazei;

— interferonul ar induce sinteza unei proteine antivirale care devine agentul inhibitor al înmulţirii diferitelor feluri de virusuri. Interferenţa poate avea o deosebită importanţă practică. O imunizare cu vaccin viu (slab) de virus poliomielitic poate condiţiona apărarea mucoasei intestinale, faţă de alte

* Properdina este un cuvînt care derivă din latinescul perdere = a pierde.

Scanned with OKEN Scanner

enterovirusuri, datorită acţiunii directe sau indirecte a interferonului. Alte date importante cu privire la interferon sînt prezentate în Capitolul VII.

10.4 LIZOZIMUL

Lizozimul (muramidaza) sau N-acetilmuramid-glicano-hidrolaza). Este o proteină enzimatică, puternic bazică cu punct izoelectric 10,9 şi cu greutate moleculară 14 500. A fost obţinut în stare cristalină (din albuşul de ou). Structura şi secvenţa sa aminoacidică sînt cunoscute în prezent. Cei 130 aminoacizi constitutivi sînt aşezaţi într-un singur lanţ peptidic cu cinci punţi disulfurice intracatenare. Are cca 25% din resturile aminoacidice în regiuni structurale α-helicoidal. Aproape toate grupările polare sînt la exteriorul moleculei iar cele hidrofobe către interior. Din punct de vedere enzimatic este o β-glucozaminidază ce hidrolizează legăturile glicozidice, specifice, între resturile aminozaharurilor, N-acetilglucozamina şi acidul N-acetil-muraminic, aşezate alternant. Substratul său natural este mureina. Recent s-au obţinut modele de difracţie cu raze X pentru cristalele de lizozim legate cu un substrat oligozaharidic. Legarea substratului produce modificări conformaţionale ale enzimei.

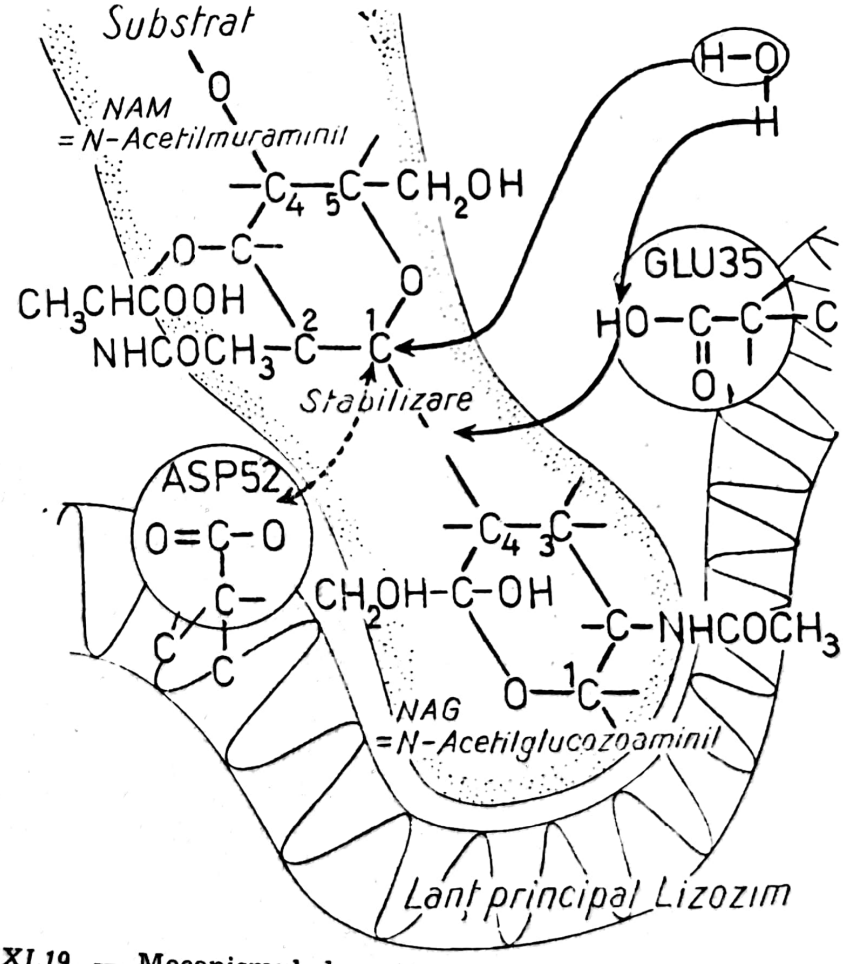


Fig. XXI.19. — Mecanismul de acţiune al Lizozimului — rolul acidului glutamic din poziţia 35 şi al acidului aspartio din poziţia 52.

Mecanismul de acţiune şi structura lizozimului din jurul situsului catalitic sînt redate în fig. XXI. 19 (după Lehninger — adaptat). Modelul ilustrează ipoteza că restul acid glutamic din poziţia 35 şi restul acid aspartic din po-

ziţia 52, din lanţul peptidic al lizozimului, cooperează pentru a produce hidroliza legăturii glicozidice a substratului. Un atom de hidrogen din restul aminoacidului Glu-35, acţionează asupra legăturii glicozidice dintre cele două resturi glucide: carboxilul restului acid aspartic-52, stabilizează ionul carbon (din poziţia C_1) al inelului N-acetil-muraminil (NAM).

Lizozimul este prezent la om în lacrimi, salivă, secreţie mucoasă digestivă, plasmă etc. El provoacă liza mai multor bacterii $Gram^+$ dizolvînd peretele celular prin hidroliza legăturilor 1—4 glicozidice ale scheletului polizaharidic al mureinei. Peretele bacteriilor $Gram^+$ este mai rigid, iar al celor $Gram^-$ mai suplu, datorită bogăţiei de lipide şi lipoproteine.

10.5. REACŢII DE HIPERSENSIBILITATE

Sînt cunoscute două moduri de reacţie de hipersensibilitate:

— *de tip imediat*, avînd la bază reacţia antigenelor cu anticorpii solubili. În această modalitate reacţională intră şocul anafilactic*, fenomenul Arthus**, Schwartzman-Sanarelli***, boala serului****;

— *de tip întîrziat*, mediată celular prin limfocitele T, ca în fenomenul de rejecţie a grefelor.

Din punct de vedere biochimic simptomatologia acestor manifestări este corelată cu revărsare de histamină, serotonină şi heparină (din mastocite).

Există analogii între reacţiile de hipersensibilitate şi cele inflamatorii. *Inflamaţia* trece prin mai multe faze în care intervin şi factori biochimici cunoscuţi. Faza conflictului dintre agresor şi ţesut produce acţiuni determinate de natura acestuia. În cazul agenţilor microbieni intervin: capsula, peretele celular şi substanţele conţinute. Se produc acţiuni enzimatice din partea microbului prin hialuronidază (liza MPZ) din ţesuturi, colagenază (distrugerea fibrelor conjunctive), lecitinază (descompunerea fosfatidelor din membranele celulare), DRN-aze (distrugerea nucleilor). În ţesutul invadat glicogenoliza şi glicoliza anaerobă se intensifică, cu acumulare de lactat, scăderea pH, degradarea proteinelor. Ca urmare a parezei vasculare se produc: hiperemie, stază şi acumulare de celule (leucocite polimorfonucleare predominant). Intervin şi substanţe provenite din elementele tisulare fie din agentul microbian care acţionează în fenomenul inflamator, *prostaglandinele*, *opsoninele*, ca urmare a acţiunii complementului, care favorizează fagocitoza. Fenomenele biochimice ale fagocitozei şi bactericidiei sînt caracterizate prin intervenţia enzimelor lisosomale şi prin complexe mecanisme energetice expuse în capitolul de biochimie a sîngelui. Din mastocite se liberează histamină, serotonină, bradikinină, compuşi adenilici şi polipeptide, cu rol în fenomenele vasculare şi în condiţionarea durerii locale. În faza tîrzie a inflamaţiei creşte rezistenţa specifică a organismului prin apariţia de anticorpi specifici.

---

* Şoc anafilactic se produce la reinjectarea antigenului şi este caracterizat prin: scăderea TA, numărului trombocitelor şi a coagulabilităţii sîngelui, dispnee, bronhospasm, lezarea ficatului etc.

** Hipersensibilitate locală, manifestată ca inflamaţie, după injecţii repetate ale unui antigen în acelaşi punct.

*** Necroză locală la locul de injecţie, după introducerea intravenoasă (repetată) a antigenului.

**** Boala serului caracterizată prin: edeme, reacţii urticariene, artralgii provocate după reinjectarea unui ser.

Scanned with OKEN Scanner

11. PATOLOGIA BIOCHIMICĂ A SISTEMULUI IMUN

Se cunosc modificări patologice atît *prin deficitul* cît şi *prin proliferarea sistemului imun.*

Din prima categorie ne vom referi, în primul rînd, la deficitul imun primar, înnăscut, din care fac parte patru sindroame bine conturate: agamaglobulinemia tip Bruton; sindromul Di George; agamaglobulinemie cu limfopatie (tip Elveţia), sindromul Aldrich.

Există şi deficit secundar al sistemului imun prin:

— diminuarea sintezei datorită absenţei factorilor alimentari;

— distrugerea ţesuturilor formatoare;

— unele hematopatii maligne (leucoze de exemplu);

Deficitul imun primar:

— *Agamaglobulinemia congenitală*, tip *Brulon*, prin lipsă de limfocite B şi plasmocite. Este o afecţiune congenitală cu transmisie recesivă, legată de sex, caracterizată biochimic prin: absenţa sau diminuarea celor trei tipuri de imunoglobuline (IgG, IgM, IgA). Clinic afecţiunea se caracterizează prin: predispoziţii la infecţii grave, cu germeni banali; imunitatea celulară este intactă.

— *Sindromul Di George*, prin lipsa de limfocite T caracterizat biochimic prin: prezenţă de anticopri (imunoglobuline), cu răspuns imun tulburat prin alterarea cooperării intercelulare BT. Imunitatea celulară este limitată, cu apărare defectuoasă faţă de virusuri.

— *Agamaglobulinemia* cu limfocitopenie (tip Elveţia) caracterizată biochimic prin prăbuşirea imunoglobulinelor plasmatice de tip IgM şi IgA (sau numai IgM) fără scădere marcată a IgG şi fără aplazie a seriei plasmocitare. Clinic, afecţiunea se manifestă prin tulburări de creştere, infecţii recidivante, moarte în cca 2 ani (18 luni).

— *Sindromul Aldrich* (eczema trombocitopenică) boală cu transmisie recesivă, legată de sex, caracterizată biochimic prin scăderea IgM şi clinic prin: eczemă severă, trombocitopenie, melenă.

Există şi deficit secundar al sistemului imun prin:

— *diminuarea sintezei* datorită absenţei factorilor alimentari (excepţional ca în kwashiorkor), distrugerea ţesuturilor formatoare (radioterapie, tratament cu imunodepresoare, hemopatii maligne-leucoze).

Modificări patologice prin proliferarea sistemului imun. Din categoria a doua se menţionează principalele gamopatii monoclonale: plasmocitomul sau mielomul multiplu (boala Kahler) şi boala Waldenström (macroglobulinemia cu IgM). Fracţiunile imunoglobulinice omogene apar cu vîrfuri abrupte pe electroforegramă, atît în aceste două boli cît şi în alte stări clinice, studiate şi clasate de Osserman, Waldenström, Takatsuki, în intervalul 1959—1965, ca boala lanţurilor grele, limfoame, neoplasme, creşteri idiopatice de imunoglobuline.

Imunoglobulinele monoclonale au configuraţia imunoglobulinelor normale, dar lanţul lor peptidic este structurat omogen. Prin formare de polimeri unele IgM, IgA pot manifesta o aparentă heterogenitate la ultracentrifugare. În 65% din cazuri proteina monoclonală (IgG 55%, IgA 25%, IgD şi IgE extrem de rar) este asociată cu mielomul multiplu, boală malignă a plasmocitelor, caracterizată clinic prin leziuni osoase, asociate cu tulburarea funcţiei renale,

Scanned with OKEN Scanner

anemie, hipercalcemie, susceptibilitatea la infecţii. În cca 50% din cazuri, proteinuria Bence-Jones este prezentă iar în 20% dintre acestea, constituie singura manifestare a producerii de proteină monoclonală.

În 10% din cazuri, în ţesuturi se depozitează amiloid. Una din caracteristicile esenţiale ale globulinei mielomatoase este prezenţa exclusivă, fie a lanţurilor $\varkappa$, fie a lanţurilor λ. Diagrama imunelectroferetică prezintă anomalii variate ca de ex.: arc dublu gama G, întăriri locale, arc bifid sau dispariţii de arce; la nivel gama A se remarcă întăriri generalizate, concavitate, bifiditate etc.

Utilizarea serurilor monospecifice este indispensabilă diagnosticului cert. Proteinele Bence-Jones în urină se pun în evidenţă — inconstant — prin caracterul lor de termosolubilitate şi mult mai evident, prin imunoelectroforeza după concentrarea urinei (prin introducerea urinei într-un sac de celofan sau membrană Wisking care se imersează apoi în soluţie PVC 20%).

Se cunosc şi mieloame cu lanţuri H (γ, α sau μ). Secvenţa aminoacidică a acestor lanţuri este normală, dar în porţiunile lor variabile se produc „deleţii" aşa încît ele nu mai au structura necesară pentru a se lega cu lanţurile uşoare.

Macroglobulinemia Waldenström. Este diferită ca manifestare clinică. Limfadenopatia şi splenomegalia sînt comune. Proteinuria Bence-Jones poate fi întîlnită în 10—15% din cazuri. Măduva hematopoietică este infiltrată cu limfocite mici. Se observă adesea hipervîscozitatea sîngelui.

Patologia autoimună. Bolile autoimune, asociate cu alterarea anticorpilor. Menţionăm dintre acestea boala reumatoidă, lupusul sistemic eritematos, sindromul Sjögrens (inflamaţia cronică a glandelor lacrimale şi salivare), tiroidita limfocitică (boala Hashimoto), anemii hemolitice cu autoanticorpi (anticorpi la „cald" sau la „rece"), colita ulceroasă etc. În bolile autoimune poate fi vorba de o tulburare a mecanismului de recunoaştere a selfului de non self. Este implicată poate o dispoziţie genetică dependentă de genele care reglează sistemul de histocompatibilitate majoră.

Scanned with OKEN Scanner

BIBLIOGRAFIE

BAEHNER R. L., NATHAN D. G. — Quantitative Nitroblue Tetrazolium Test in Chronic Granulomatous Disease, New Engl., *J. Med.*, 1968, *278*, 971

BAIRD A. T. (sub red.) — Imunology, Upjonn Company, Kalamazo, Michigan, 1975

BEUTLER E. — Red Cell Metabolism, Grune and Stratton Inc., New York, 1975

BEDELEANU D., KORY M. — Metabolismul medicamentelor, Edit. Dacia, Cluj-Napoca, 1976

BERCEANU ŞT. (sub redacţia) — Hematologie clinică, Edit. medicală, Bucureşti, 1977

BOULANGER P., POLONOVSKI J., TAYEAU F., MANDEL P., BISERTE G. — Biochimie médicale (fasc. I, II, III), Masson et Cie, Paris, 1971—1973

BROWN R. J. — Structure of bovine serum albumin, Session III of the FASEB Conference on Genetics and Biological Evolution, Atlantic City, New Jersey, 1975, *Fed. Proc.*, 1975, 34, 591

BROWN R. J. — Structural origin of mammalian albumin, Session III of the FASEB Conference on Genetics and Biological Evolution, Atlantic City, New Jersey 1975, *Fed. Proc.*, 1976, 35, 2141

BUDDECKE E. — Grundriss der Biochemie, Gruyter und Co., Berlin, 1970

CHANCE B., KENDALL P. E., AMAL K. G., HESS B. — Biological and Biochemical Oscilators, Academic Press Inc., New York, 1973

COODLEY E. — Diagnostic Enzymology, Lea and Febiger, Philadelphia, 1970

CRISTEA ELENA — Curs de Biochimie, partea I, Litografia, Inst. de medicină şi farmacie, Bucureşti, 1975

CRISTEA ELENA — Curs de biochimie, partea a II-a, Litografia Instit. de medicină şi farmacie, Bucureşti, 1976

CUCUIANU M. — Biochimie clinică, Edit. Dacia, Cluj-Napoca, 1977

CUNNINGHAM B. — Structure and Significance of β_2-microglobulin, *Fed. Proc.*, 1976, 35, 1171

CURTIUS H. CH., ROTH M. — Clinical Biochemistry. Principles and Methods, Gruyter und Co., Berlin, 1974

DESNICK R. J., THORPE S. R., FIDDLER M. B. — Toward Enzyme Therapy for Lysosomal Storage Diseases, *Physiol. Rev.*, 1976, 56, 57

DRAYER E. D. — Pathwys of Drug Metabolism in Man, Symposium of Individualization of Drug Therapy, *Med. Clin. N. Amer.*, 1974, 58, 927

DUCA E. — Microbiologie medicală, Edit. didactică şi pedagogică, Bucureşti, 1974

FLORKIN M., STOTZ E. H. — Comprehensive Biochemistry, vol. 1—27 Elsevier, N. Y. Uitgevers Mij., Amsterdam, 1962—1967

FREDRICKSON D. S., LEVY R. I., LEES R. S. — Fat Transport in Lipoproteins — An Integrated Approach to Mechanisms and Disorders, *New Engl. J. Med.*, 1967, 276, 34

FREDRICKSON D. S. — An International Classification of Hyperlipidemias and Hyperlipoproteinemias, *Ann. Int. Med.*, 1971, 75, 471

GEROK W., SICKINGER K. (Herausgegeben von) — Drugs and the Liver, 3-rd International Symposium 12—14 octomber, Freiburg, 1973, Schattauer-Verlag, Stuttgart, 1975

GHEŢIE V. — Semnale şi receptori în imunologie, Edit. ştiinţifică şi enciclopedică, Bucureşti, 1977

Scanned with OKEN Scanner

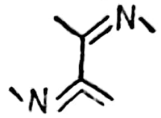
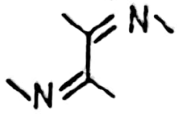
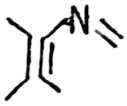
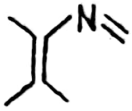
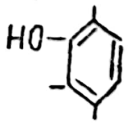
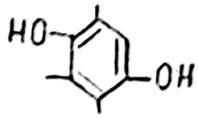
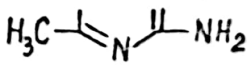
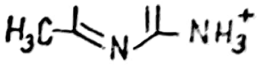
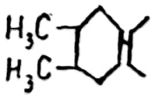
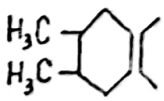
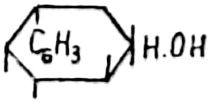
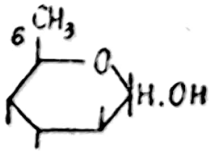
GIBLETT R. E. — Genetic Markers in Human Blood, Blackwell Scientific Publications Ltd., Oxford, 1969
GREAVES M. F., OWEN J. J., RAFF M. C. — T and B Lymphocytes. Origins, Properties and Roles in Immune Responses, Elsevier N. V. Uitgevers Mij., Amsterdam, 1974
GRABAR P., BURTIN P. — Imuno-Electrophoretic Analysis, Elsevier N. V. Uitgevers Mij., Amsterdam, 1964
HARPER H. A., LŐFFLER G., PETRIDES P. E., WEISS L. — Physiologische Chemie, Springer Verlag, OHG, Berlin, 1975
HARPER H. A., RODWELL V. W., MAYES P. A. — Review Physiological Chemistry, Lange Medical Publications, Los Altos, 1977
HARRIS E. J. — Factors Determining Permeation Rates: Energetics of Permeation, In: Transport and Accumulation in Biological Systems", University Press, Baltimore, 1972
HENRI R. J. — Clinical Chemistry, Principles and Techniques, Harper and Brothers, New York, 1974
HUXLEY A. F. — The Origin of Force in Skeletal Muscle, in Energy Transformation in Biological Systems, Ciba Foundation Symposium, London, 1974, Elsevier N. V. Uitgevers Mij., Amsterdam, 1975
KARNOVSKY L. M. — Chronic Granulomatous Disease-Pieces of a Cellular and Molecular Puzzle. In: The Biochemistry of Disease, Symposium of the American Society for Experimental Pathology, Atlantic City, New Jersey, 1972, *Fed. Proc.* 1973, 32, 1 587
KATZ H. D., AMERDING D. — The Role of Histocompatibility Gene Products in Lymphocyte Triggering and Differentiation in Symposium of the American Association of Immunologists, Atlantic City, New Jersey, 1975, Cellular and Soluble Factors in the Regulation of Lymphocyte, *Fed. Proc.*, 1976, *35*, 2053
KEYNES R. D. — The Ionic Channels in Excitable Membranes, in Energy Transformation in Biological Systems, Ciba Foundation Symposium, 1974, Elsevier N. V. Uitgevers Mij., Amsterdam, 1975
KRUH J. — Biochimie, Etudes medicales et biologiques, Edition Hermann, Paris, 1971
LA DU BERT N., MANDEL H. G., WAY E. L. — Fundamentals of Drug Metabolism and Drug Disposition, Williams and Wilkins Company, Baltimore, 1972
LANG H., RICK W., ROKA L. (Herausgeber) — Optimierung der Diagnostik, Merck Symposium der deutschen Gesellschaft für klinische Chemie, Mainz, 1973, Springer, Verlag, Berlin, 1973
LANG H., RICK W., ROKA L. (Herausgeber) — Anwendung immunologischer Methoden Merck Symposium der deutschen Gesellschaft für klinische Chemie, Mainz, 1975, Springer-Verlag, Berlin, 1975
LARNER J. — Intermediary Metabolism and its Regulation, Prentice-Hall Inc., New York, 1971
LEHNINGER A. L. — Biochemistry. The Molecular Basis of Cell Structure and Function, Worth, Foundation Inc., New York, 1975
LEMBERG R., BARRETT J. — Cytochromes, Academic Press Inc., New York, 1973
MAHLER H. R., CORDES E. H. — Biological Chemistry, Harper and Brothers, New York, 1971
MAUNHERZ H. G., GOODY R. S. — Proteins of contractile Systems, *Ann. Rev. Biochem.*, 1976, *45*, 428
MANTA I., BENGA G., CUCUIANU M., HODÂRNĂU A. — Metode biochimice în laboratorul clinic, Edit. Dacia, Cluj-Napoca, 1976
MARKERT C. (sub red.) — Izozymes Molecular Structure and Physiological Function, 3-rd International Conference: in Izozymes, Yale University 1974, Academic Press Inc., New York, 1975
MESROBEANU I., BERCEANU ST. (sub red.) — Imunobiologie, Imunochimie, Imunopatologie, Edit. Acad. R.S.R., București, 1975
MEZINCESCU M. D. — Lecții de electrochimia soluțiilor, Litografia Instit. de medicină și farmacie, București, 1963
MICU D. — Cellular Pathology of the Lymphoid Organs, Idelson, Naples, 1972
MILCU ST. M., PITIȘ M. — Endocrinologie clinică, Edit. didactică și pedagogică, București, 1976
MILLS J. N. (sub red.) — Biological Aspects of Circadian Rhythms, Plenum Press, London, 1973
MINCU I., HÎNCU N. — Dislipidemiile, Edit. medicală, București, 1976
MINCU I. — Diabetul zaharat, Edit. medicală, București, 1977
MONOD J. — Le Hasard et la Nécessité, Editions du Seuil, Paris, 1970
MONTGOMERY R., DRYER R. L., CONWAY T. W., SPECTOR A. A. — Biochemistry. A Case Oriented Approach, C. V. Mosby Company, St. Louis, 1974
MÜLLER G. — Klinische Biochemie und Labordiagnostik, VEB Gustav, Fischer Verlag, Jena, 1977

Scanned with OKEN Scanner

NEEDLEMAN P., MARSHALL R. G. — Angiotensin Antagonists: Overview and Projection, In: Symposium of the Federation of American Societies for Experimental Biology, Atlantic City, New Jersey, 1975, The Pharmacology of Angiotensin Antagonists, *Fed. Proc.*, 1976, *35*, 2486
PERUTZ M. F. — Stereochemical Mechanism of Cooperative Effects in Haemoglobin, Coloque CNRS: Bases Moleculaires de la Pathologie 1971, *Biochem. J.*, 1972, *54*, 587
PETERS TH. Jr. — Serum Albumin: Recent Progress in the Understading of its Structure and Biosynthesis, *Clin. Chem.*, 1977, *23*, 5
POPESCU AURORA — Curs de biochimie, partea I, Litografia Instit. de medicină și farmacie, București, 1972
POPESCU AURORA — Curs de biochimie, partea a II-a, Litografia Instit. de medicină și farmacie, București, 1972
POPESCU AURORA — Curs de biochimie, Litografia Instit. de medicină și farmacie, București, 1977
RAPOPORT S. M. — Medizinische Biochemie, VEB Verlag, Volk und Gesundheit, Berlin, 1975
ROSSI F., ROMED D., PATRIARCA P. — Mechanism of Phagocytosis. Associated Oxidative Metabolism in Polymorphonuclear Leucocytes and Macrophages, *J. Ret. Endot. Soc.*, 1972, *12*, 127
ROWLAND T. D., DANIELE P. R. — Surface Receptors in the Immune Response, *New Engl. J. Med.*, 1975, *293*, 26
SBARRA A. J., PAUL B. B., JACOBS A. A., STRAUSS R. R., MITCHELL G. W. — Role of the Phagocyte in Host-Parasite Interactions. Metabolic Activities of the Phagocyte as Related to Antimicrobial Action, *J. Ret. Endot. Soc.*, 1972, *12*, 109
SCHAPIRA G. — Eléments de biochimie humaine, chimie physiologique et semiologique, Flammarion et Cie, Paris, 1970
SCHULTZE H. E., HEREMANS J. — Molecular Biology of Human Proteins, vol. I, Elsevier, N. V. Uitgevers Mij., Amsterdam, 1966
STARK R. G. (sub red.) — Biochemical Aspects of Reactions on Solid Supports, Academic Press Inc., New York, 1971
STROESCU V. — Farmacologie clinică, Edit. medicală, București, 1977
STRYER L. — Biochemistry W. H., Freeman and Company, San Francisco, 1925
ȘERBAN M., COTARIU D. — Biochimia contracției musculare, Edit. Acad. R.S.R., București, 1970
TAUSSIG J. M., MUNRO A. J. — Antigenic Specific T-Cell Factor in Cell Cooperation and Genetic Control of the Immune Response in Symposium of the American Association of Immunologists, Atlantic City, New Jersey, 1975, Cellular and Soluble Factors in the Regulation of Lymphocyte Activation, *Fed. Proc.*, 1976, *35*, 2044
TĂNĂSESCU GH., POPA M. V., VĂRĂDEANU A. — Glucidele, Edit. medicală, 1973
TEICHMANN W. — Untersuchungen von Harn und Konkrementen, VEB Verlag Volk und Gesundheit, Berlin, 1975
TEODORESCU-EXARCU I. — Explorarea paraclinică, Edit. medicală, București, 1970
TEODORESCU-EXARCU I. (sub red.) — Patologie biochimică, Edit. medicală, București, 1974
THOMPSON R. H. S., WOOTTON I. D. P. (sub red.) — Biochemical Disorders in Human Diseases, Academic Press Inc., New York, 1970
TIETZ N. W. — Fundamentals of Clinical Chemistry, Saunders Company, W. B. Philadelphia, 1976
TUOMISTO J., PAASONEN M. K., KARKI N. T. (sub red.) — Proceedings of the Sixth International Congress of Pharmacology, Helsinki, 1975, vol. 6: Mechanisms of Toxicity and Metabolism, Pergamon Press Ltd., Oxford, 1976
VÎLCU AL. — Eritrocitul, Edit. medicală, București, 1977
VOICU V., OLINESCU R. — Mecanisme enzimatice în farmacodinamie, Edit. științifică și enciclopedică, București, 1977
ZAMFIRESCU-GHEORGHIU M. — Izoenzime în patologie, Edit. medicală, București, 1970
* * * — Metode de Laborator de uz curent, Ministerul Sănătății și Academia de Științe Medicale, vol. I și II, Edit. medicală, București, 1974 și 1977
* * * — Tables scientifiques, Edition Ciba-Geigy, Bâle, 1972

Scanned with OKEN Scanner

ERATA

Pag	Rîndul	În loc de:	Se va citi:
32	2. de sus	9 nmol	9 mmol
58	13. de jos	aldehidei	formaldehidei
92	17,23 de sus	absorbție	adsorbție
106	17. de jos		
160	7, de jos	incorversiuneo	interconversiuneo
174	20. de sus		
436	5. de jos	adenocorticotropina	adrenocorticotropina
436	4. de jos	adenocorticotropic	adrenocorticotropic
445	9. de jos	60%	65%
475	ultimul	NAD + NADH..	NAD + NADPH...
503	primul	hematom	hepatom
515	subsol	LDH	LDH_1
520	24. de sus	..bis 5,5'ditionitrobenzoic	..5,5' Ditiobis-(2-nitrobenzoic)
548	4. de jos	hidrolizarea	hidroxilarea
554	Fig.XV.12	$Ca(PO_4)_2$	$Ca_3(PO_4)_2$
558	5. de sus	sunetului	șuntului
574	9, de jos	peroxid	anion superoxid
584	9. de sus	... + E - P + P_i	... + E + PP_i
608	19. de jos	concentrației	contracției
650	subcapit.7	Clearence	Cleorance
687	ultimul		
692	7, de sus		
693	6. de jos		
724	2. de sus și formula	L-fructoza 	L-fucoza 
724	ultimul	...-D-galactozamină	...-D-galactozamină sau N-acetil-D-glucozamină
725	Fig.XXI,5 mijloc, stînga	———	Gena A
726	3, de sus	...acetil-galactozaminică	...acetil-glucozaminică

Scanned with OKEN Scanner

Redactor de carte: Dr. MIRCEA ROTARU
Tehnoredactor: VIOLANDA LEORDEANU

Bun de tipar: 24.VII.1980.
Formatul: 16/70×100
Hîrtie: Tipar înalt, ilustrații 70×100/56
Coli de tipar: 48,5.

Tiparul executat sub cda. 96.
la Întreprinderea Poligrafică „Crișana",
Oradea, str. Moscovei nr. 5.
Republica Socialistă România

Scanned with OKEN Scanner